

Universidad Autónoma de Madrid



Facultad de Medicina Departamento de Pediatría

Desarrollo de un procedimiento de inmunoterapia oral con huevo: La clara de huevo deshidratada como fuente alérgica, eficacia, seguridad y estudio inmunológico

Tesis Doctoral
Carmelo Escudero Díez

Director de tesis
María Dolores Ibáñez Sandín

Madrid, 17 de enero de 2020

D^a. M^a Dolores Ibáñez Sandín, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe de Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid y Jefe de Grupo de Investigación en Alergología del Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa,

CERTIFICA: Que **D. Carmelo Escudero Díez**, Licenciado en Medicina por la Universidad de Valladolid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado “Desarrollo de un procedimiento de inmunoterapia oral con huevo: La clara de huevo deshidratada como fuente alérgica, eficacia, seguridad y estudio inmunológico”, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Madrid a 17 de enero de 2020.

Fdo.: D^a. M^a Dolores Ibáñez Sandín

Agradecimientos

A los pacientes y sus familias, *primum movens* de este estudio, que, con su confianza, esfuerzo y solidaridad, contribuyeron a dar luz a un nuevo tratamiento.

A Paloma Ibáñez, por tu magisterio, fuerza, valor y motivación mucho más allá de este trabajo, gracias por confiar en mi.

A Silvia Sánchez y Pablo Rodríguez, mis compañeros de viaje, con los que la Medicina, además de *ciencia, oficio, arte y misión*, se convierte en una apasionante aventura.

A Ascensión López, Inmaculada Sanz, Catalina Quiñonero, Felicia López, Carmen Ballesteros, Esperanza Doval, María Jesús Jiménez y Lourdes Pascual, que con extraordinaria destreza y cariño lograsteis cada día lo imposible para hacer posible este proyecto.

A Carlos Pastor, el mago del Laboratorio, que hiciste visibles las partes invisibles de esta investigación.

A Napoleón Pérez y Cristina García, que de un mar de datos destilasteis unos resultados que ya no olvidaremos.

A Joaquín Sastre, Santiago Quirce, Manuel de las Heras y Javier Cuesta, por *aquellos maravillosos años*, mis Maestros en Alergología, me enseñasteis a amar la investigación y no dejáis de hacerlo.

Al Hospital del Niño Jesús, donde la humanidad tiene uno de sus faros.

A Cristina, mi *templanza*, mi *prudencia*, mi *fortaleza*, mi *justicia*, mi amor.

A mis hijos, mi vida.

A mis padres, todo, ejemplo de amor, sacrificio y honradez, ejemplo en cada acción.

A mi hermano, con el que seguiré emprendiendo nuevos caminos,
el mejor vino está por venir.

A mi tío Juan José, que me contagió la pasión por aprender.

A la memoria de mi abuelo José, que me enseñó a no dejar de hacerme preguntas.

A la memoria de Luis Couselo, mi profesor de Biología en el Colegio Lourdes, que me
abrió los ojos a la ciencia.

A Castilla, a León y al Pisuerga, por qué no dedicar una tesis a las tierras y al río
que uno ama.

Índice

Glosario de abreviaturas	9
Índice de Figuras	11
Índice de Tablas	13
1. Resumen	15
2. Introducción	23
2.1. La alergia al huevo	24
2.1.1. Introducción	24
2.1.2. Definición y epidemiología de la alergia a los alimentos y al huevo	25
2.1.3. Clasificación y etiopatogenia de la alergia al huevo	27
2.1.4. Diagnóstico de la alergia al huevo	29
2.1.5. Las fuentes alergénicas en el diagnóstico de la alergia al huevo	31
2.1.6. Pronóstico	33
2.1.7. Factores relacionados con la persistencia de la alergia al huevo	35
2.1.8. Las proteínas de huevo como alérgeno oculto y como alérgeno en productos no alimentarios	36
2.1.8.1. Alérgeno oculto	36
2.1.8.2. Vacunas y medicamentos que contienen proteínas de huevo	37
2.1.9. Tratamiento actual de la alergia al huevo	38
2.2. Inmunoterapia oral (ITO) con huevo (ITOH)	38
2.2.1. Concepto y fases de la ITO	38
2.2.2. Indicaciones y contraindicaciones de la ITO	41
2.2.3. Mecanismo de acción de la ITO	41
2.2.4. Eficacia clínica de la ITOH	42
2.2.5. Seguridad de la ITOH	43
2.2.6. Modulación de la respuesta inmunológica por la ITOH	45
2.2.7. Productos de huevo utilizados para ITOH	46
2.2.8. La ITOH en términos de tolerancia permanente (TP) o falta de respuesta mantenida	48
2.2.9. Beneficios y debilidades de la ITOH	50
3. Justificación del estudio, Hipótesis de trabajo, Objetivos y Aplicabilidad	53
3.1. Justificación del estudio	54
3.2. Hipótesis de trabajo	55
3.3. Objetivos	55
3.3.1. Objetivo principal	55
3.3.2. Objetivos secundarios	55
3.4. Aplicabilidad y utilidad práctica	56
4. Metodología	59
4.1. Diseño del estudio y ética	60
4.2. Centros de trabajo y financiación	60
4.3. Participantes	61
4.3.1. Estudio de la alergenidad de la clara de huevo deshidratada (CHD)	61
4.3.2. Ensayo clínico sobre la seguridad y eficacia del tratamiento de ITOH	61
4.4. Generación de los grupos, tiempos del estudio e intervenciones	63
4.4.1. Aleatorización y generación de los grupos	63
4.4.2. Tiempos del estudio e intervenciones	64
4.5. Datos demográficos y antecedentes clínicos	68

4.6. Fuente alérgica: CHD.....	69
4.7. Procedimientos <i>in vivo</i>	69
4.7.1. Pruebas cutáneas.....	69
4.7.2. Pruebas de exposición oral controlada.....	70
4.7.2.1. Pruebas de exposición oral abierta con clara de huevo cruda (CHC) y CHD	70
4.7.2.2. Prueba de exposición oral doble ciego con CHD controlada con placebo para el ensayo clínico de ITOH.....	72
4.7.3. Inmunoterapia oral con huevo.....	73
4.7.4. Seguimiento durante la ITOH: Clasificación de las reacciones adversas.....	75
4.7.5. Exploración de la TP e intervenciones posteriores.....	77
4.7.6. Seguimiento a largo plazo.....	78
4.8. Procedimientos <i>in vitro</i>	79
4.8.1. Determinaciones de IgE e IgG ₄ sérica a huevo y sus fracciones proteicas.....	79
4.8.2. Electroforesis de la CHD y la CHC en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE).....	80
4.8.3. Inmunotransferencia de IgE.....	80
4.8.4. Inhibición de la inmunotransferencia de IgE.....	81
4.8.5. Análisis de citoquinas Th1 y Th2 en suero durante la ITOH.....	81
4.9. Tamaño de la muestra del ensayo clínico de ITOH.....	82
4.10. Análisis estadístico.....	82
5. Resultados.....	85
5.1. Estudio de la alergenidad de la clara de huevo deshidratada.....	86
5.1.1. Participantes.....	86
5.1.2. Pruebas cutáneas.....	86
5.1.3. Determinaciones de IgE.....	86
5.1.4. SDS-PAGE.....	88
5.1.5. Inmunotransferencia de IgE e inhibición de la inmunotransferencia de IgE.....	89
5.1.6. Pruebas de exposición oral abierta con CHD y CHC.....	90
5.2. Eficacia clínica y seguridad del tratamiento de ITOH.....	91
5.2.1. Participantes.....	91
5.2.2. Eficacia clínica: Desensibilización y TP.....	98
5.2.2.1. Grupo de intervención (GI).....	98
5.2.2.2. Grupo de intervención 2 (GI2).....	101
5.2.3. Seguridad.....	103
5.2.3.1. Reacciones adversas (RAs) en el GI.....	103
5.2.3.1.1. Fase de inducción rápida (FIR).....	103
5.2.3.1.2. Fase de inducción lenta (FIL).....	105
5.2.3.1.3. Fase de mantenimiento.....	105
5.2.3.2. RAs en el GI2.....	106
5.2.4. Cambios inmunológicos.....	106
5.2.5. Identificación de los factores predictores de TP.....	109
5.3. Análisis de citoquinas Th1 y Th2 en suero durante la ITOH.....	111
5.4. Seguimiento a largo plazo.....	112
6. Discusión de resultados.....	117
7. Conclusiones.....	135
8. Referencias.....	139

9. Anexos.....	157
9.1. Anexo I: Consentimientos informados.....	158
9.2. Anexo II: Registro para la selección de pacientes del estudio de ITOH.....	166
9.3. Anexo III: Esquemas del estudio de investigación y resumen de intervenciones.....	168
9.4. Anexo IV: Historia clínica y valoración basal.....	169
9.5. Anexo V: Prueba de exposición oral doble ciego con CHD controlada con placebo (PODCCP)...	171
9.6. Anexo VI: Recetas de enmascaramiento de las pruebas de exposición oral en ciego.....	172
9.7. Anexo VII: Protocolo de la fase de inducción de la ITOH con CHD.....	173
9.8. Anexo VIII: Información para padres y pacientes.....	177
9.9. Anexo IX: Clasificación de la gravedad de las reacciones adversas.....	181
9.10. Anexo X: Calendario y registro de seguimiento.....	182
9.11. Anexo XI: Cuestionario telefónico de seguimiento.....	183
9.12. Anexo XII: Artículos científicos publicados.....	187
9.12.1. Dehydrated egg white: An allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy.....	187
9.12.2. Early sustained unresponsiveness after short-course egg oral immunotherapy: a randomized controlled study in egg-allergic children.....	195
9.13. Anexo XIII: Trayectoria del doctorando.....	211
9.13.1. Cursos de Doctorado y Líneas de investigación.....	211
9.13.1.1. Cursos de doctorado.....	211
9.13.1.2. Líneas de investigación relacionadas con el ámbito del estudio.....	211
9.13.2. Producción científica relacionada con el ámbito del estudio.....	212
9.13.2.1. Revistas.....	212
9.13.2.2. Libros.....	213
9.13.2.3. Premios recibidos, comunicaciones y ponencias en Congresos Nacionales e Internacionales.....	213
9.13.2.3.1. Premios recibidos.....	213
9.13.2.3.2. Comunicaciones.....	216
9.13.2.3.3. Ponencias.....	217

Glosario de abreviaturas

AINE:	Antiinflamatorio no esteroideo.
CH:	Clara de huevo.
CHD:	Clara de huevo deshidratada.
CHC:	Clara de huevo cruda.
CVRS:	Calidad de vida relacionada con la salud
DE:	Desviación estándar.
EAACI:	European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
FI:	Fase de inducción o de incremento de dosis.
FIL:	Fase de inducción o de incremento de dosis lenta.
FIR:	Fase de inducción o de incremento de dosis rápida.
FM:	Fase de mantenimiento.
GC:	Grupo de control.
GI:	Grupo de intervención.
GI2:	Grupo de intervención 2.
IC:	Intervalo de confianza.
IgE:	Inmunoglobulina E.
IgG4:	Inmunoglobulina G de la isoforma 4.
IL:	Interleucina.
ITO:	Inmunoterapia oral con alimentos.
ITOH:	Inmunoterapia oral con huevo.
OVA:	Ovoalbúmina.
OVM:	Ovomucoide.
PC:	Pruebas cutáneas intraepidérmicas.
PEOC:	Prueba de exposición oral abierta controlada.
PODCCP:	Prueba de exposición oral doble ciego controlada con placebo.
RAs:	Reacciones adversas.
RIC:	Rango intercuartílico.
RR:	Relación de riesgo.
sIgE:	IgE sérica específica.
sIgE-C:	IgE sérica específica para clara de huevo.
sIgE-H:	IgE sérica específica para huevo.
sIgE-OVA:	IgE sérica específica para ovoalbúmina.
sIgE-OVM:	IgE sérica específica para ovomucoide.
sIgG4-C:	IgG4 sérica específica para clara de huevo.

SEAIC:	Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica.
SOF:	Síntomas orofaríngeos.
SRCC:	Coefficiente de correlación de rangos de Spearman.
TP:	Tolerancia permanente.

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de las reacciones por hipersensibilidad a los alimentos de la Comisión de Nomenclatura de la EAACI refrendada por la WAO.

Figura 2: Esquema de las diferentes fases y objetivos de la inmunoterapia oral.

Figura 3. Esquema del estudio de inmunoterapia oral con huevo.

Figura 4. SDS-PAGE con CHD y CHC. Inmunotransferencia de IgE con un pool de sueros de los pacientes que tuvieron las pruebas de exposición oral con CHD y CHC positivas. Inmunotransferencia de IgE control negativo con suero de pacientes no alérgicos.

Figura 5. Inhibición de la inmunotransferencia de IgE utilizando alternativamente en la fase sólida y en la inhibición, CHD y CHC.

Figura 6. Pacientes con pruebas de exposición oral abierta positivas: dosis que desencadenaron síntomas.

Figura 7. Diagrama de flujo y distribución de los pacientes en los diferentes grupos del estudio. Reclutamiento para el estudio de inmunoterapia oral con huevo, aleatorización y resultados.

Figura 8. Cambios en la dosis umbral puntual media de los pacientes del GI y GC que no superaron la PODCCP en T2.

Figura 9. Diagrama de flujo y distribución de los pacientes del GI2.

Figura 10. Potencial discriminativo de la IgE sérica específica a los 3 meses de comenzar la ITOH en el resultado de las PODCCP a los 4 meses (1 mes después de suspender la inmunoterapia oral con huevo).

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales alérgenos del huevo.

Tabla 2. Fuentes alérgicas utilizadas en los tratamientos de ITOH (Ibáñez y cols. 2015).

Tabla 3. Calendario de actividades y evaluaciones para cada grupo de intervención y tiempo de estudio.

Tabla 4. Población analizada por cada objetivo del estudio.

Tabla 5. Esquema de dosificación de las pruebas de exposición oral con CHD y CHC.

Tabla 6. Protocolo de ITOH. FIR y FIL.

Tabla 7. Características clínicas e inmunológicas basales, y resultado de las PEOC con CHC y CHD de los pacientes incluidos en el estudio de alergenidad de la CHD.

Tabla 8. Resultados de las pruebas de exposición oral abierta positivas con CHC y CHD, dosis que desencadenaron síntomas y síntomas durante las pruebas. Incluye los resultados de las pruebas cutáneas con los dos tipos de clara de huevo.

Tabla 9. Características clínicas e inmunológicas de la alergia a huevo y respuesta a la ITOH por cada participante del ensayo clínico.

Tabla 10. Características clínicas basales y PODCCP con CHD según el grupo de estudio. Prueba de t de Student y prueba de chi-cuadrado.

Tabla 11. Reacciones adversas durante la ITOH en el GI.

Tabla 12. Evolución del diámetro mediano de pápula de las pruebas cutáneas y de los niveles de IgE e IgG4 sérica específicas en los grupos GI y GC.

Tabla 13. Parámetros inmunológicos del GI en T1 de acuerdo con los resultados de las PODCCP en T2.

Tabla 14. Parámetros inmunológicos del GI2 en T3 de acuerdo con los resultados de las PODCCP en T4.

Tabla 15. Análisis de citoquinas Th2 y Th1 (2º ensayo de laboratorio). Significación estadística (*P*) de las diferencias entre los niveles de citoquinas en los tiempos estudiados.

Tabla 16. Resultados de eficacia de la ITOH para desensibilización y TP en los diferentes tiempos del estudio.

Tabla 17. Marcadores inmunológicos de los pacientes tratados con éxito tras 7 años de seguimiento.

1

Resumen

Desarrollo de un procedimiento de inmunoterapia oral con huevo: La clara de huevo deshidratada como fuente alérgica, eficacia, seguridad y estudio inmunológico.

Doctorando: Carmelo Escudero Díez

Introducción:

El huevo es, junto a la leche, la causa más común de alergia a los alimentos entre los niños. La alergia a los alimentos afecta a su calidad de vida y es una condición que puede poner en peligro la vida del paciente. La inmunoterapia con alimentos representa un tratamiento etiológico potencial más allá de la dieta de evitación.

Objetivos:

Principal:

- Analizar la seguridad y la eficacia de un protocolo de inmunoterapia oral con huevo (ITOH) de corta duración para inducir tolerancia permanente (TP) a corto (4 meses), medio (19 meses) y largo plazo (7 años) en niños y adolescentes con alergia persistente al huevo.

Secundarios:

- Estudiar la alergenidad de una clara de huevo deshidratada (CHD) para su utilización en el diagnóstico y tratamiento de la alergia al huevo.
- Analizar la seguridad y la eficacia de un protocolo de ITOH de corta duración para inducir desensibilización a corto (3 meses), medio (18 meses) y largo plazo (7 años) en niños y adolescentes con alergia persistente al huevo.

- Estudiar los cambios en el umbral de tolerancia en la prueba de exposición oral con huevo doble ciego controlada con placebo (PODCCP) realizada tras suspender la ITOH en aquellos pacientes que no alcancen la TP.
- Analizar los cambios en el tamaño de la prueba cutánea y los niveles de IgE e IgG₄ sérica específica frente a las fracciones del huevo, y los cambios en los niveles séricos de citoquinas Th1 y TH2 de pacientes que reciben ITOH.
- Estudiar la relación entre las diferentes respuestas clínicas a la ITOH y los parámetros inmunológicos.
- Detectar posibles predictores individuales para desarrollar TP.
- Describir la situación clínica y los hábitos de alimentación a los 7 años de iniciarse la ITOH.

Metodología:

La primera cuestión que se planteó para realizar el tratamiento de ITOH fue disponer de una fuente alergénica similar a la clara de huevo cruda, cuya alergenicidad es máxima, y que fuese al mismo tiempo segura microbiológicamente para su manipulación. Se comparó la alergenicidad de una clara de huevo deshidratada (CHD) disponible comercialmente con la de la clara de huevo cruda (CHC) y se analizó su eficacia para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia al huevo mediante ITOH en la práctica clínica.

Se realizó un reclutamiento prospectivo de pacientes con el diagnóstico de alergia al huevo y una edad comprendida entre los 2 y 17 años de la Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid. Los pacientes fueron sometidos a pruebas cutáneas mediante la técnica de prick test, a extracciones de sangre para realizar los estudios inmunológicos y a pruebas de exposición oral abierta controlada (PEOC) con ambas fuentes alergénicas (CHC y CHD).

La clara de huevo deshidratada fue utilizada posteriormente como fuente alergénica para realizar un ensayo controlado y aleatorizado que investigó la seguridad y eficacia de un tratamiento de ITOH. El protocolo de intervención fue diseñado para la administración de dosis crecientes de CHD (fase de inducción o incremento - FI -) a lo largo de 8 semanas. El

objetivo del protocolo fue el de alcanzar la tolerancia de una CHC y la posterior introducción del huevo en la dieta en forma de un huevo entero poco cocinado que el paciente debía tomar cada 48-72 horas.

Para el ensayo clínico se realizó un segundo reclutamiento prospectivo de pacientes con el diagnóstico de alergia al huevo y una edad comprendida entre los 5 y 17 años de la misma Sección. Los candidatos que tuvieron una prueba de exposición oral con huevo doble ciego controlada con placebo (PODCCP) positiva fueron asignados de manera aleatoria a los grupos de intervención (GI) y control (GC) según una razón 1:1. Los pacientes del GI suspendieron la ITOH a los 3 meses de su inicio para seguir posteriormente una dieta de evitación de huevo durante 1 mes. El GC siguió la dieta de evitación durante 4 meses. La eficacia de la ITOH para desarrollar desensibilización y TP al huevo fue evaluada a los 4 meses del inicio del tratamiento. Los pacientes de ambos grupos fueron sometidos a una PODCCP en ese tiempo.

Los pacientes del GI y el GC que no superaron la PODCCP a los 4 meses formaron un nuevo grupo de intervención (GI2). En el GI2 se analizó la eficacia de la ITOH para desarrollar desensibilización a lo largo de 18 meses de tratamiento y para desarrollar TP a los 19 meses (tras haber suspendido la ITOH y seguir una dieta de evitación durante 1 mes). El análisis estadístico se realizó con respecto a los pacientes incluidos con intención de tratar.

Para el estudio inmunológico se analizaron los niveles de IgE e IgG4 sérica específica a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide en diferentes tiempos de la ITOH. Además, fueron estudiados los niveles séricos de citoquinas que intervienen en las respuestas Th1 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13) y Th2 (IFN- γ , IL-2 y TNF- α) a los 3, 12 y 18 meses del inicio del ITOH.

Para estudiar la evolución clínica a largo plazo se evaluó el comportamiento clínico, los hábitos de alimentación respecto al huevo y un cuestionario de satisfacción de los pacientes tratados con ITOH tras 7 años de seguimiento.

Resultados:

Los resultados de las pruebas cutáneas y las PEOC mostraron que la CHD tiene la misma alergenidad *in vivo* que la CHC. No se observaron inconsistencias en los resultados de ambas pruebas, ni diferencias significativas en las dosis que produjeron síntomas durante las PEOC ni en los síntomas observados durante las mismas. Los resultados de la inmunodetección de IgE, así como la inhibición de la inmunodetección de IgE, revelaron que la clara de huevo deshidratada mantiene intactos los alérgenos de la clara de huevo sensibles al calor y que estos son similares a los de la clara de huevo cruda.

Treinta pacientes fueron aleatorizados al GI y 31 al GC. El 93,3% (28/30) de los pacientes que recibieron ITOH fueron desensibilizados en una media de 32,5 días (desviación estándar -DE- 14). La duración media de la FI en los pacientes que necesitaron menos de 3 meses para ser desensibilizados (83,3%, 25/30) fue de 30 días (DE 10,4). El 10% (3/30) de los pacientes del GI necesitó más de 3 meses para ser desensibilizados (media 121 días, DE 16,8) debido a la aparición de RAs durante el tratamiento.

A los 4 meses, el 36,6% (11/30) de los pacientes del GI superó la PODCCP con huevo, comparado con el 3,2% (1/31) de los pacientes del GC con una prueba negativa (intervalo de confianza -IC- 95%, 14 a 51%; $P = 0,003$).

Los pacientes del GI (17/30) y del GC (29/31) que no superaron la PODCCP a los 4 meses formaron un nuevo grupo de intervención (GI2) que recibió ITOH durante 18 meses siguiendo un protocolo modificado. Los padres de un paciente del GC (1/31) decidieron posponer el inicio del tratamiento. La duración media de la FI fue de 35 días (DE 18,01). El 93,5% (43/46) de los pacientes fueron desensibilizados. El 47,8% (22/46) pasaron la PODCCP a los 19 meses desarrollando la TP. Uno de los pacientes que completó con éxito el tratamiento no acudió a realizar la exposición y fue una pérdida de seguimiento.

Todos los pacientes que recibieron ITOH y pasaron la PODCCP posterior al tratamiento, tanto a los 4 como a los 19 meses, continuaron tomando huevo a voluntad.

Los pacientes del GI ($n = 14$) que no pasaron la PODCCP a los 4 meses aumentaron sin embargo su dosis media umbral (dosis que produce reacción) de 100,8 mg de proteína de

clara de huevo (DE 96,3 mg) al inicio del tratamiento a 481,3 mg (DE 417,5 mg) a los 4 meses. Esta dosis fue significativamente mayor a la dosis umbral de los pacientes del GC a los 4 meses (media 256,2 mg, DE 425,3 mg) ($P = 0,02$).

Los participantes que alcanzaron la TP en los diferentes tiempos del ensayo fueron: 36,7% (11/30) a los 4 meses, 54,1% (33/61) a los 19 meses y 70,5%, (43/61) a los 7 años de ITOH. Los pacientes siguieron consumiendo huevo a voluntad una vez alcanzada la TP.

El 70% de los pacientes del GI presentó reacciones adversas (RAs) durante la ITOH. Hubo 145 RAs, 21 (14,5%) durante el primer día de tratamiento, 79 (54,5%) en la FI y 45 (31%) en la fase de mantenimiento. El 98% de las RAs fueron leves y el 2% moderadas. Una RA requirió el uso de adrenalina intramuscular. El 6,7% (2/30) de los pacientes del GI fueron retirados del estudio por RAs repetidas durante la FI, principalmente dolor abdominal y vómitos.

El 58,7% de los pacientes del GI2 presentó RAs durante la ITOH. El 99,7% fueron RAs leves. Hubo una reacción moderada (urticaria generalizada, rinitis y dificultad respiratoria leve) y una reacción grave (urticaria generalizada y dificultad respiratoria grave). En ambos casos fue precisa la administración de una dosis de adrenalina. El 6,5% (3/46) de los pacientes del GI2 fueron retirados del estudio por RAs repetidas (rinitis, vómitos y dolor abdominal), uno durante la FI y dos en la FM.

El tamaño de las pruebas cutáneas para clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide disminuyó a los 4 meses del inicio de la ITOH en los pacientes del GI. En ese tiempo también hubo una disminución en los niveles de IgE sérica específica a clara, ovoalbúmina y ovomucoide, que solo fue significativa para la ovoalbúmina.

La edad basal, el sexo, la historia de asma, la historia de anafilaxia previa con la ingestión de huevo, la frecuencia y gravedad de las RAs durante la ITOH y la dosis que desencadenó los síntomas en la PODCCP basal, no fueron predictores potenciales de los resultados de la PODCCP a los 4 meses. Sin embargo, los niveles de IgE sérica específica a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide fueron a los 3 meses de tratamiento más bajos en los pacientes que alcanzaron la TP a los 4 meses que en aquellos en los que la PODCCP

resultó positiva (1,8, 0,8 y 0,6 vs 9,1, 4,2 y 6,4, respectivamente, $P < 0,02$). El punto de corte que mostró los mejores valores para predecir el resultado de la PODCCP a los 4 meses fue 7,1 kU/L para la IgE sérica a clara de huevo y 1,7 kU/L para la IgE sérica a ovomucoide. La probabilidad de que el resultado de la PODCCP fuese positivo con valores de IgE sérica por encima de los puntos de corte fue del 90% y 73%, respectivamente.

No se detectaron cambios sostenidos de los niveles séricos de citoquinas que intervienen en las respuestas inmunológicas Th1 y Th2 a lo largo de los primeros 18 meses de ITOH.

El 89% (54/61) de los pacientes incluidos en el estudio según el análisis por intención de tratar, y el 92% (54/59) según el análisis por protocolo, completaron con éxito el tratamiento de ITOH y seguían tomando huevo a voluntad. El 70,5% (43/61) alcanzaron la TP frente al alimento a lo largo de este periodo de seguimiento.

Todos los pacientes se mostraron satisfechos con el tratamiento de ITOH y no hubo ninguno que hubiese preferido no realizar el tratamiento. A pesar de esta observación, el 14% de los pacientes relató que presentaba cierto grado de ansiedad al consumir huevo.

Conclusiones:

Los estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la clara de huevo deshidratada es una fuente alergénica recomendable para el diagnóstico de la alergia al huevo en la práctica clínica mediante la prueba de exposición oral, sustituyendo al huevo crudo.

El protocolo desarrollado para ITOH es eficaz en pacientes con alergia al huevo. El 88,5% de los pacientes que siguieron el tratamiento obtuvieron el estado de desensibilización al alimento y hasta el 70,5% de los pacientes el estado de TP a lo largo del seguimiento. En los pacientes desensibilizados que no alcanzaron la TP aumentó el umbral de tolerancia de manera significativa.

Hasta el 70% de los pacientes presentaron reacciones adversas durante la ITOH. Sin embargo, más del 98% de estas fueron leves. Se produjo una reacción grave y en 3 reacciones fue preciso el uso de adrenalina intramuscular.

Los niveles de IgE sérica a clara, ovoalbúmina y ovomucoide fueron a los 3 meses de tratamiento más bajos en los pacientes que alcanzaron la TP a los 4 meses. Los niveles de IgE sérica a clara de huevo y ovomucoide tras 3 meses de tratamiento mostraron la mejor capacidad para predecir la TP. El seguimiento de los niveles de IgE sérica específicos a fracciones de huevo a lo largo de la ITOH podría utilizarse para establecer el momento más apropiado para detener el tratamiento y explorar el desarrollo de la TP.

No se detectaron cambios sostenidos en los niveles séricos de citoquinas Th1 y Th2, considerando por tanto que tienen escaso valor en el seguimiento de pacientes que siguen ITOH.

Por último, los pacientes que intervinieron en el ensayo clínico refirieron estar satisfechos de haber seguido el tratamiento de ITOH.

2

Introducción

2.1. La alergia al huevo

2.1.1. Introducción

El huevo de gallina (*Gallus gallus*) ha sido desde la antigüedad, un alimento fundamental para el hombre. Debido a su carácter de alimento básico y muy apreciado, el huevo ha sido motivo de interés desde tiempos inmemoriales y hoy en día sigue siendo objeto de estudio e investigación desde diversos ámbitos.

El consumo de huevos de aves tiene su origen en la India y China hace más de 8000 años. Desde entonces su consumo se ha generalizado prácticamente por todo el mundo y constituye en la actualidad una importante fuente de proteínas, estando integrado como uno de los alimentos básicos de la dieta humana desde el primer año de vida. Entre el año y los 3 años de vida los requerimientos de proteínas son elevados y el huevo tiene un importante papel a la hora de cubrir estas necesidades. Es una fuente rica en proteínas de alto valor biológico y la riqueza en aminoácidos esenciales de la clara del huevo y el equilibrio entre ellos hacen que el huevo sea considerado de referencia para valorar la calidad de las proteínas procedentes de otros alimentos (Instituto de Estudios del Huevo 2009).

El peso de un huevo mediano oscila entre los 53 y 63 g, de los cuales aproximadamente la clara representa el 60%, la yema el 30% y la cáscara, junto a las membranas, el 10% del total. En la clara se almacenan aproximadamente el 55% de las proteínas de un huevo, seguida de la yema con un 34% y de la cáscara que acumula el 11% de las proteínas. La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (12%). La proteína más importante de la clara, no solo en términos cuantitativos (54% del total proteico), es la ovoalbúmina, cuyas propiedades son de especial interés tanto desde el punto de vista nutritivo como culinario. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo, y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50% y los sólidos o materia seca de la yema se reparten entre proteínas (18%) y lípidos (35%), quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides.

Las diferentes propiedades del huevo (emulsionante, lubricante, surfactante, espumante, etc.) ofrecen múltiples posibilidades de utilización en la cocina. Además, para la

industria alimentaria y la restauración colectiva, los ovoproductos (pasteurizados líquidos y deshidratados de huevo) ofrecen algunas ventajas frente al huevo en cáscara: mayor versatilidad, fácil empleo y dosificación, manipulación sencilla, mejor control de la seguridad microbiológica y fácil distribución. Los ovoproductos pueden destinarse al consumo humano directo o a su procesamiento por industrias para formar parte de otros productos, y su uso se ha extendido ampliamente en la industria alimentaria (Instituto de Estudios del Huevo 2004).

El huevo se ha convertido en un alimento ubicuo, forma con frecuencia parte de la composición de multitud de alimentos preparados y es utilizado ampliamente tanto por la restauración como por la industria alimentaria. Por todo ello, los pacientes que padecen alergia al huevo tienen una importante dificultad para evitar su ingestión. Este hecho se traduce en un aumento del riesgo de sufrir reacciones alérgicas por su ingestión inadvertida y tiene como consecuencia final una considerable afectación de su calidad de vida.

2.1.2. Definición y epidemiología de la alergia a los alimentos y al huevo

La alergia a los alimentos se define como un efecto adverso en la salud que surge de una respuesta inmunológica específica que se reproduce tras la exposición a un alimento (Johansson y cols., 2004). Esta definición incluye las respuestas inmunológicas mediadas por anticuerpos IgE, las no mediadas por IgE, o bien, las producidas por la combinación de ambas repuestas, de acuerdo con las guías internacionales (Johansson y cols., 2001, Fiocchi y cols., 2010, Sackeyfio y cols., 2011, Urisu y cols., 2011).

La alergia a los alimentos representa ya un problema de salud pública de importante magnitud cuya prevalencia ha aumentado de manera significativa durante los últimos 10 años (Prescott y cols., 2011). Afecta a más del 1-2% de la población (Scheneider y cols., 2010), al 3,9% de la población infantil (Umasunthar y cols., 2015), al 7% de los preescolares (Prescott y cols., 2013) y hasta el 10% de los niños de un año de edad (Osborne y cols., 2011).

En España, si analizamos los datos de Alergológica relativos al número de pacientes que acuden a consulta por alergia a alimentos, observamos un aumento progresivo de la frecuencia de visitas por esta patología: 4% (IC 95%: 3,4-4,6%) en 1992, 7,4% (IC 95%: 6,7-8,1%) en 2005 y el 11,4% (IC 95%: 10,3-12,6%) en 2015. Si comparamos los datos,

podremos observar cómo la alergia a los alimentos casi se ha triplicado en poco más de dos décadas (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica 1995, Ibáñez y cols., 2009 y Alergológica 2015). En los menores de 14 años, la alergia a los alimentos es la tercera patología diagnosticada por los alergólogos en orden de frecuencia tras la rinoconjuntivitis y el asma, siendo la primera en los menores de 5 años de edad. El 20% de los menores de 14 años son diagnosticados de alergia a alimentos, lo que supone un aumento significativo con respecto a Alergológica 2005 (Ibáñez y cols., 2009) donde representaron el 14,5%. Sin embargo, si atendemos solamente a los datos de los menores de 5 años esta cifra se eleva hasta el 38,1%.

El huevo, junto a la leche, es la causa más común de alergia a los alimentos entre los pacientes, afectando entre el 1,6% y el 8,9% de los de 1 a 3 años de edad (Eggesbø y cols., 2001, Osterballe y cols., 2005, Osborne y cols., 2011). En España, representa la segunda causa en los menores de 3 años tras la leche, la cuarta entre los 3-5 años y la tercera entre los 6-15 años de edad (Alergológica 2015).

Por otro lado, la incidencia de anafilaxia inducida por alimentos ha aumentado significativamente a lo largo del tiempo. El Registro Europeo de Anafilaxia ha confirmado que los alimentos son el principal inductor de anafilaxia en niños, específicamente el huevo, la leche de vaca y los frutos secos (Worm y cols., 2018). Estos datos son congruentes con las observaciones de otros estudios en los que el huevo, además de ser uno de los alimentos que produce alergia con más frecuencia, es también el responsable del mayor número de casos de anafilaxia en este grupo de edad, por delante de la leche, el cacahuete y los frutos secos (Motosue y cols., 2018, Samady y cols., 2018).

La alergia al huevo es considerada un marcador de riesgo para el desarrollo de otras patologías alérgicas, como la sensibilización a aeroalérgenos (Nickel y cols., 1997) y el asma (Ricci y cols., 2006). Una historia familiar de atopia y la presencia de valores de IgE específica para huevo > 2 kU/L a los 12 meses de vida son marcadores altamente específicos (99%) y predictivos (VPP del 78%) para el desarrollo de sensibilización a aeroalérgenos a los 3 años de edad (Sicherer y cols., 2014). Si la alergia al huevo se asocia además a dermatitis atópica, el riesgo de padecer una patología alérgica respiratoria a los 4 años de edad se eleva al 80% (Boyano y cols., 2008).

2.1.3. Clasificación y etiopatogenia de la alergia al huevo

El desarrollo de la sensibilización y alergia a las proteínas de un alimento dependen de la interacción entre la predisposición genética del paciente a padecer patologías alérgicas y los factores que influyen en la exposición al alimento. Se han implicado como factores que influyen en esta sensibilización la dosis y naturaleza del antígeno, la exposición de la madre a las proteínas del alimento durante el embarazo, la transmisión de las proteínas del alimento a través de la leche materna, la exposición de la piel al alérgeno, la frecuencia de administración de este en la dieta del paciente, etc. (Björkstén y cols., 1994, Lack y cols., 2003).

La alergia a un alimento está definida como una reacción adversa de hipersensibilidad que se produce por una respuesta inmunológica específica y reproducible por exposición a un alimento determinado (Boyce y cols., 2010). Las reacciones de hipersensibilidad a alimentos no desencadenadas por un mecanismo inmunológico no se consideran reacciones alérgicas (Figura 1) (Johansson y cols., 2001, Johansson y cols., 2004). Las reacciones alérgicas a los alimentos han sido clasificadas en tres categorías según el mecanismo inmunológico implicado: Mediadas por IgE, mixtas (mediadas por IgE y por células) y no mediadas por IgE (mediadas por células) (Boyce y cols., 2010, Sicherer y cols., 2014). Las más frecuentes son las mediadas por IgE, que se caracterizan por su inicio inmediato (< 1 hora) tras la ingestión del alimento, pudiendo afectar cualquier órgano (piel, aparato digestivo, respiratorio y/o cardiovascular), y excepcionalmente, tras la inhalación de aerosoles de huevo en trabajadores de panadería y pastelería sensibilizados a sus proteínas provocando síntomas respiratorios (Escudero y cols., 2003).

La alergia alimentaria no mediada por IgE se caracteriza por la aparición tardía de los síntomas tras la exposición al alérgeno (desde una hora hasta varios días tras la ingestión) y sus manifestaciones en niños son habitualmente gastrointestinales. Su frecuencia en el contexto de alergia a los alimentos es desconocida, aunque menor que la de la alergia mediada por IgE y engloba diferentes entidades entre las que se incluyen los síndromes de enterocolitis inducida por proteínas de alimentos, proctocolitis alérgica y enteropatía inducidas por proteínas alimentarias, la esofagitis eosinofílica y la dermatitis atópica exacerbada y/o causada por alimentos (Nowak-Węgrzyn y cols., 2015).

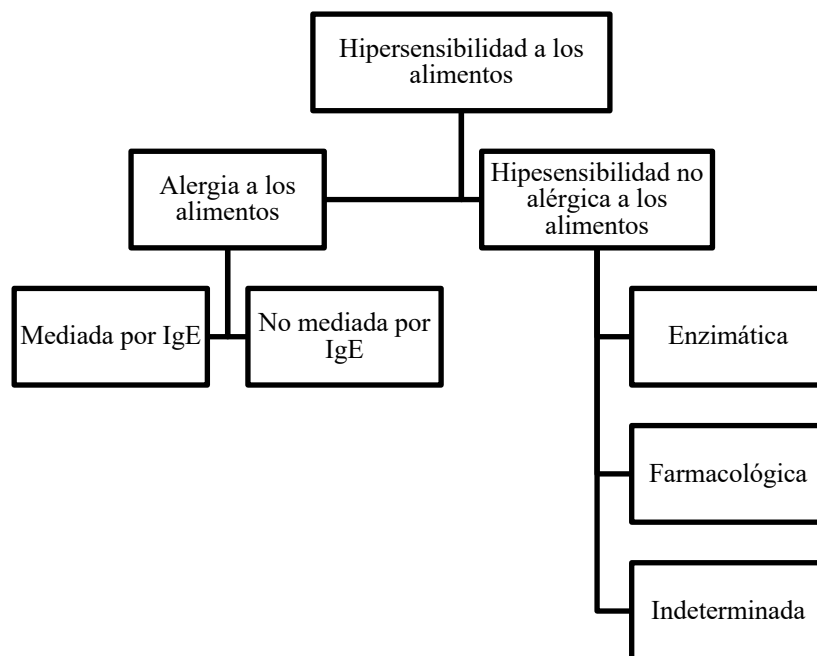


Figura 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos de la Comisión de Nomenclatura de la EAACI refrendada por la WAO.

Tanto la clara como la yema contienen proteínas potencialmente alergénicas (Tabla 1) (Tratado de Alergología 2015). La clara contiene más de 20 glicoproteínas diferentes y es la parte más alergénica del huevo (Hofmann y cols., 1983). El ovomucoide (OVM, Gal d 1) es el alérgeno más importante de la clara del huevo, seguido de la ovoalbúmina (OVA, Gal d 2), la conalbúmina u ovotransferrina (Gal d 3) y la lisozima (Gal d 4) (Bernhisel-Broadbent y cols., 1994, Langeland y cols., 1983, Holen y cols., 1990).

La sensibilización más frecuente se produce frente a la OVA (87%), seguida del OVM (72%), la conalbúmina (69%) y la lisozima (58%) (Everberg y cols., 2011). A pesar de ello, el OVM es la proteína más alergénica debido a su termoestabilidad y es considerado como el alérgeno dominante. La sensibilización a este alérgeno es útil como marcador de persistencia de la alergia al huevo. La ausencia de sensibilización a OVM es un predictor de tolerancia al huevo cocido (Urisu y cols., 1999, Jarvinen y cols., 2007).

Tabla 1. Principales alérgenos del huevo.

Proteína	Total de proteína (%)	MM kDa	Aminoácidos	Alérgeno
Clara				
Ovomucoide	11	28	186	Gal d 1
Ovoalbúmina	54	45	385	Gal d 2
Conalbúmina (ovotransferrina)	13	78	686	Gal d 3
Lisozima	3,5	14,3	129	Gal d 4
Yema				
Albúmina sérica (α -livetina)	14	69	592	Gal d 5

MM, masa molecular; **Gal d**, *Gallus domesticus*. Fuente: Tratado de Alergología. Tomo III. 2ª edición.

La yema contiene α -livetina o albúmina sérica de gallina (Gal d 5), proteína implicada en el síndrome ave-huevo que afecta sobre todo a adultos que tienen contacto con aves. Dichos pacientes presentan síntomas respiratorios (rinitis y/o asma) tras sensibilizarse por vía inhalatoria a la α -livetina presente en el suero y en las plumas de las aves al ser secretada por las glándulas uropigiales. Los síntomas iniciales son respiratorios y con el tiempo se producen reacciones alérgicas tras la ingestión de yema o carne de pollo, sobre todo si están poco cocinadas (Quirce y cols., 2001).

2.1.4 . Diagnóstico de la alergia al huevo

Los objetivos fundamentales en el diagnóstico de la alergia a los alimentos son, por una parte, el establecimiento de la asociación causal entre la ingestión del alimento y las manifestaciones clínicas referidas por el paciente, por otra, confirmar el posible mecanismo inmunológico que interviene en la reacción y, finalmente, determinar que la sensibilización a dicho alimento es la causa de la clínica alérgica. Con todo ello, se planificará e instaurará el tratamiento.

En el caso de las reacciones inmediatas, una historia clínica rigurosa se completa con la demostración de la sensibilización mediada por anticuerpos IgE frente al alimento, mediante pruebas cutáneas y/o su determinación en suero. Ambos métodos asociados tienen

en general una sensibilidad diagnóstica y un valor predictivo aceptables, pero una pobre especificidad (Diéguez y cols., 2009). Esto implica que en ocasiones haya que recurrir a la prueba de exposición oral controlada con el alimento (PEOC) para disponer de un diagnóstico de certeza. A pesar de que es una prueba en la que existe riesgo de que se produzca una reacción alérgica, dados los beneficios que reporta al paciente un resultado negativo, el riesgo que es necesario asumir es razonable cuando la prueba se realiza bajo condiciones adecuadas (Burks y cols., 2012). Se considera que la prueba de exposición oral controlada con placebo (PODCCP) es la prueba patrón oro, siendo la prueba más específica para el diagnóstico de alergia a los alimentos (Ibáñez y cols., 1999).

La selección de la fuente alergénica para realizar la PEOC tiene especial importancia en el diagnóstico de la alergia al huevo. El huevo es un alimento cuyas proteínas se alteran en gran medida por el efecto del calor o el procesamiento (Mine y cols. 2002). La OVA, la lisozima y la ovotransferrina son alérgenos termolábiles (Mine y cols., 2008), mientras que el OVM se caracteriza por su alta estabilidad térmica, posiblemente como resultado de sus fuertes puentes disulfuro (Hirose y cols., 2004). Por tanto, el perfil de sensibilización a las diferentes proteínas del huevo será determinante en el resultado de una PEOC con huevo según se utilice una fuente alergénica calentada o cruda. En este sentido, podemos diferenciar dos fenotipos esenciales de pacientes con alergia al huevo, los que toleran el huevo cocinado y los que no. El grado de sensibilización a OVM distingue esencialmente un fenotipo del otro. Los pacientes que presentan valores de IgE séricos frente a OVM más elevados no toleran generalmente el huevo cocinado mientras que sí lo hacen aquellos con los niveles más bajos (Urisu y cols., 1997). Así, hay pacientes con alergia al huevo que pueden superar una PEOC con huevo cocinado y sin embargo presentar reacciones graves cuando son expuestos al huevo crudo (Eigenmann y cols., 2000). Por lo tanto y en base a este hecho, la selección correcta de la fuente del alergénica para el diagnóstico de la alergia al huevo mediante la PEOC será esencial.

Las fuentes alergénicas utilizadas generalmente para las PEOC son: el huevo fresco crudo, el huevo fresco cocinado (revuelto, en tortilla o cocido) y el huevo en forma de ovoproductos. El uso de huevo fresco crudo para realizar la PEOC asegura la estabilidad e integridad del alimento, y en consecuencia la alergenidad de las proteínas administradas,

ya que estas no están sometidas a la acción del calor (Nowak-Wegrzyn y cols., 2009). Teniendo en cuenta este principio, se podría considerar que el huevo crudo es el mejor material para realizar las PEOC. Sin embargo, el uso del alimento en su forma cruda entraña el riesgo de que se produzcan enfermedades transmitidas por los alimentos y causadas por agentes como *Salmonella* spp (Braden y cols., 2006). Por otro lado, el uso de huevo cocido en las PEOC evitaría el riesgo de toxiinfección alimentaria, aunque como se ha apuntado, la alergenicidad de sus proteínas puede verse reducida por efecto del calor y afectar el resultado de la prueba, sobre todo en aquellos pacientes con niveles más bajos de IgE frente a OVM.

Como alternativa, los productos de huevo procesados pasteurizados, disponibles en forma líquida y deshidratada, garantizan un alto nivel de seguridad alimentaria, previniendo el riesgo de aparición de estas enfermedades. Los ovoproductos son huevos enteros, claras o yemas que han sido transformados mediante un proceso industrial, normalmente térmico (pasteurización, cocción, deshidratación, liofilización o congelación), para ser utilizados como ingredientes de otros alimentos en la hostelería o en los procesos de la industria alimentaria. Además, estos productos conservarían en principio la estructura y alergenicidad de sus proteínas, lo que les convertiría en las fuentes alergénicas idóneas para la realización de las PEOC.

2.1.5. Las fuentes alergénicas en el diagnóstico de la alergia al huevo

Como se indicó en el apartado sobre diagnóstico de la alergia al huevo, la selección de la fuente alergénica para realizar la PEOC tiene especial importancia.

Las proteínas del huevo se alteran en gran medida por el efecto del calor o el procesamiento, factores que pueden afectar su estructura y reducir la alergenicidad de algunas de ellas (Mine y cols., 2008). Esto se traduce en que algunos pacientes que no toleran una fuente no modificada, cuyas proteínas están íntegras, sí toleran fuentes sometidas a la acción del calor en las que la estructura e integridad de sus alérgenos se han podido ver afectadas (Urisu y cols., 1997).

El uso de huevo cocinado o cocido en las PEOC evita el riesgo de toxiinfección

alimentaria, aunque como se ha apuntado, su alergenicidad puede verse reducida por efecto del calor. Este tipo de fuente alergénica puede utilizarse cuando el paciente muestra una baja sensibilización a OVM y, por tanto, cuando la sospecha de que tolerará el alimento sometido a la acción del calor es alta (Furuya y cols., 2016).

El huevo fresco es la fuente alergénica más utilizada para realizar una PEOC con huevo no cocinado. La administración del alimento se realiza en su forma cruda, bien como huevo entero o como clara sola, mezclado con una matriz líquida o semisólida para mejorar su sabor. Sin embargo, como se ha comentado, el uso del alimento en esta forma entraña el riesgo de toxiinfección alimentaria por agentes como *Salmonella* spp (Braden y cols., 2006).

En este sentido, el Real Decreto 1254/1991, de 2 de agosto, dicta las normas para la preparación y conservación de alimentos de consumo inmediato en los que figure el huevo como ingrediente. Según su artículo 1.º, el Real Decreto se aplica a la elaboración y conservación de alimentos de consumo inmediato en los que figure el huevo como ingrediente, especialmente mayonesas, salsas y cremas de elaboración propia en cualquier establecimiento que elabore y/o sirva comidas. El artículo 2.º indica que en la elaboración de alimentos a los que se refiere el artículo 1.º, se sustituirá el huevo por ovoproductos pasteurizados y elaborados por Empresas autorizadas para esta actividad, excepto cuando estos alimentos sigan un posterior tratamiento térmico no inferior a 75°C en el centro de estos.

Los ovoproductos garantizan un alto nivel de seguridad alimentaria, previniendo el riesgo de toxiinfección alimentaria. Son huevos enteros, claras o yemas que han sido transformados mediante un proceso industrial, normalmente térmico (pasteurización, deshidratación, cocción, liofilización o congelación) (Instituto de Estudios del Huevo 2009). La pasteurización asegura la ausencia de *Salmonella* debido al tratamiento térmico de 57 °C durante 180 segundos, lo que elimina las bacterias patógenas y el virus de la gripe aviar (Instituto de Estudios del Huevo 2004).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el huevo pasteurizado líquido y el huevo pasteurizado deshidratado podrían reunir las condiciones necesarias para su utilización en las PEOC y los tratamientos de ITO. Sin embargo, se desconocía si estos productos podían ver alteradas la estructura y alergenicidad de sus proteínas como consecuencia del

tratamiento térmico al que son sometidos.

Jurado-Palomo y cols., (Jurado-Palomo y cols., 2010) en un estudio realizado en 32 pacientes con alergia al huevo, no encontraron diferencias relevantes en la alergenicidad de la clara de huevo fresca y la clara de huevo pasteurizada líquida mediante estudio *in vivo* e *in vitro*. El perfil proteínico y la capacidad de unión a IgE de la clara de huevo tanto pasteurizada como fresca observados mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de IgE fueron prácticamente idénticos. En los ensayos de inmunoblotting inhibición e inhibición de ImmunoCAP, ambos extractos se comportaron de manera similar. El estudio apoyó el uso de la clara de huevo pasteurizada en el diagnóstico de alergia a las proteínas frescas del huevo.

Por otro lado, el huevo pasteurizado deshidratado es otra fuente alergénica potencial para realizar las PEOC y los tratamientos de ITO (Buchanan y cols., 2007, Burks y cols., 2012). Para su obtención, el huevo pasteurizado líquido es sometido a un segundo tratamiento térmico. El producto es aerosolizado en el interior de una torre de atomización donde es expuesto a una corriente de aire a 80°C durante 1 minuto. El objetivo de dicho tratamiento es eliminar el agua para obtener un producto en polvo que resulte más fácil de conservar, almacenar y posteriormente manipular. Hasta ahora se desconocía si este procesamiento afectaba a la estructura y alergenicidad de las proteínas. La ventaja de esta fuente de clara de huevo frente a la pasteurizada es que puede ser conservada durante más tiempo sin necesidad de refrigeración, su dosificación es precisa por permitir controlar la cantidad de proteínas por peso en vez de por volumen y economiza recursos al ser consumida solamente la parte que será administrada al paciente. Las observaciones anteriores deben ser tenidas en consideración a la hora de elegir la fuente alergénica no solo para realizar las PEOC sino también los tratamientos de inmunoterapia oral.

2.1.6. Pronóstico

La evolución natural de la alergia al huevo ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, los resultados de las investigaciones son dispares, debido probablemente a las diferencias en los criterios de inclusión, definiciones de diagnóstico y periodos de seguimiento de los pacientes.

En un estudio realizado en nuestro país sobre 58 pacientes de entre 11 y 24 meses y evaluados durante un periodo de 7-86 meses desde el debut de la patología, la probabilidad de tolerancia acumulada fue del 16% a los 12 meses de seguimiento, 28% a los 24 meses, 52% a los 36 meses, 57% a los 48 meses y 66% a los 60 meses (Boyano-Martínez y cols., 2002). Sin embargo, Savage y cols. observaron en un estudio retrospectivo que la tolerancia al huevo en los pacientes alérgicos de entre 4 y 5 años de edad era de tan solo el 4% (Savage y cols., 2007).

Las diferencias observadas entre los dos estudios pudieron ser debidas a que en el primero la concentración media de IgE específica frente a proteínas de huevo de los pacientes estudiados era de 1,97 kU/l frente al segundo en el que la concentración media era de 7,3 kU/l. Además, en el segundo estudio se utilizaron 3 definiciones diferentes de tolerancia; cuando se utiliza la definición más conservadora, tolerancia al alimento comprobada mediante PEOC, la frecuencia de tolerancia a los 4 años era, como se ha indicado, del 4%. Sin embargo, cuando se utiliza la definición menos conservadora, tolerancia al alimento en una PEOC o tener una determinación de IgE <6 kU/l sin haber presentado reacciones alérgicas durante los últimos 12 meses, la frecuencia de tolerancia a los 4 años era del 19 %. Si se tomara la última definición, la tolerancia a los 8 años en el grupo estudiado por Savage y cols. sería del 58%.

Por otro lado, la tolerancia al huevo cocido puede determinar el pronóstico favorable de la patología. En un estudio de cohortes realizado sobre 101 pacientes de 12 meses de edad en los que el diagnóstico de alergia al huevo fue confirmado mediante PEOC, el 47% de ellos alcanzaron la tolerancia a los 2 años de edad. Sin embargo, la resolución de la alergia fue mayor entre los pacientes que toleraban huevo cocido a los 12 meses (56%) que en aquellos que no lo toleraban (13%). Además, entre los pacientes que lo toleraban, la probabilidad de resolución de la alergia fue 5 veces mayor en aquellos que tomaban huevo cocinado con mayor frecuencia (Peters y cols., 2002). Los niveles de IgE al alimento se relacionan con esta observación, ya que los pacientes con alergia persistente al huevo cocinado tienen valores basales de IgE específica a huevo más elevados que aquellos pacientes que toleran el huevo cocinado o los que superan la alergia (Leonard y cols., 2012).

La alergia a los alimentos afecta la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) de los pacientes que padecen esta patología (Bacal y cols., 2013), impacta en sus actividades diarias y las de sus familias (Bollinger y cols., 2006), y es una condición que puede poner en peligro la vida (Beyer y cols., 2012). Se ha demostrado que el riesgo de ingestión accidental de huevo y las limitaciones en la vida social están asociados a una peor CVRS (Stensgaard y cols., 2017). Como consecuencia de todo ello, los individuos con alergia a los alimentos tienen una CVRS peor que la de la población general y peor incluso que la de individuos con enfermedades crónicas tan conocidas como la diabetes (Jansson y cols., 2013). Además, la calidad de vida de los individuos y de sus padres se ve más afectada cuando la alergia persiste en el niño y este se hace mayor (Stensgaard y cols., 2017).

2.1.7. Factores relacionados con la persistencia de la alergia al huevo

Los factores que pueden predecir la resolución de la alergia al huevo son: las características iniciales de la reacción (urticaria aislada / angioedema versus anafilaxia), el tamaño de la pápula en la prueba cutánea y el nivel basal de IgE específica a huevo, los niveles de IgG₄ al alimento y la gravedad de la dermatitis atópica (Diéguez y cols., 2009, Sicherer y cols., 2014).

En un estudio que analizó estos factores, una cohorte de 213 pacientes con alergia al huevo de edades comprendidas entre los 3 y 15 meses, el 49,3% de los pacientes superó la alergia a los 6 años de edad. Se observó que los niveles basales de IgE específica a huevo y las características de la reacción inicial frente al alimento estaban fuertemente asociadas con la probabilidad de resolución de la alergia. Así, se observaron diferencias muy significativas ($P < 0,001$) en la tasa de resolución cuando se compararon los sujetos con diferentes niveles basales de IgE específica de huevo, siendo la probabilidad de resolución de la alergia inversamente proporcional a los valores de IgE (Sicherer y cols., 2014).

La relación IgE/IgG₄ sérica específicas a huevo también puede utilizarse como marcador de la persistencia de alergia al huevo, así como para predecir la tolerancia al huevo cocido (Tomciac y cols., 2009, Ahrens y cols., 2010, Caubet y cols., 2011). En particular, el nivel de IgE sérica para OVM puede resultar útil como marcador de persistencia de la alergia al huevo,

así como para predecir la tolerancia al huevo cocido (Urisu y cols., 1999, Järvinen y cols., 2007). La resistencia de este alérgeno frente al calor y la digestión enzimática (tanto de la tripsina como de otras proteasas) (Cooke y cols., 1997) hace que los pacientes alérgicos a esta proteína no toleren el huevo crudo ni cocido, y que su evolución hacia la tolerancia natural se prolongue en el tiempo (Urisu y cols., 1997, Eigenmann y cols., 2000).

2.1.8. Las proteínas de huevo como alérgeno oculto y como alérgeno en productos no alimentarios

2.1.8.1. Alérgeno oculto

El Reglamento de la Unión Europea exige a los fabricantes de productos alimenticios que incluyan en la etiqueta de ingredientes de sus productos la presencia de cualquiera de los 14 alérgenos de declaración obligatoria (European Parliament 2011). Entre estos alérgenos se encuentra el huevo. Al mismo tiempo y siguiendo la legislación de la Unión Europea, los estados miembros tienen el mandato de llevar a cabo programas de control de inocuidad de los alimentos para verificar el cumplimiento de los requisitos de etiquetado de los alimentos.

Sin embargo, dichos productos alimenticios pueden contener alérgenos alimentarios no declarados por los fabricantes. En un estudio que analizó la presencia de alérgenos no declarados en el etiquetado en un total de 775 muestras de alimentos, se detectó que el 3,6% contenían proteínas de huevo (Bianchi y cols., 2016). La comparación entre la concentración de alérgeno y la dosis de proteínas de huevo mínima capaz de desencadenar síntomas en una PEOC (0,03 mg) (Allen y cols., 2014), indicó que para consumidores alérgicos al huevo existía un alto riesgo de reacción en caso de exposición a estos alimentos.

2.1.8.2. Vacunas y medicamentos que contienen proteínas de huevo

En los pacientes con alergia al huevo se debe evaluar la seguridad de la administración de las vacunas que contienen proteínas de huevo (triple vírica, gripe y fiebre amarilla) (Escudero y cols., 2009).

Triple vírica

Cultivada en fibroblastos de embrión de pollo, no contiene cantidades de proteínas de huevo capaces de producir reacciones en pacientes con alergia y su administración no está contraindicada (Piquer y cols., 2007).

Vacuna de la gripe

Con un contenido variable de OVA (de picogramos a 42 µg/ml) debe administrarse fraccionada y bajo control del alergólogo en pacientes con antecedentes de anafilaxia tras la ingestión de huevo (Fung y cols., 2012).

Vacuna de la fiebre amarilla

Fabricada con virus atenuados cultivados en embriones de pollo, su contenido en proteínas de huevo es indeterminado, aunque probablemente sea mayor que el de las vacunas triple vírica y de la gripe. Su administración en pacientes con alergia al huevo debe ser evaluada por el alergólogo (Muñoz-Cano y cols., 2010).

Medicamentos que contienen proteínas de huevo

Los medicamentos que contengan proteínas de huevo, como por ejemplo la lisozima, deben ser evitados por los pacientes con alergia al huevo (Martorell y cols., 2013).

2.1.9. Tratamiento de la alergia al huevo

Hasta hace pocos años, la dieta de evitación, la estricta eliminación de la dieta del alimento responsable de la alergia, y el uso de adrenalina inyectable para el tratamiento de las reacciones alérgicas, habían sido las únicas medidas efectivas para el tratamiento de la alergia al huevo.

El huevo es uno de los alimentos más ubicuos de nuestra dieta, su amplia utilización en la preparación de alimentos a todos los niveles, tanto familiar, de restauración, como industrial, ciñe las posibilidades dietéticas de los pacientes alérgicos. Su eliminación completa de la dieta es dificultosa, por lo que el riesgo de transgresión y en consecuencia de reacción es muy elevado. Si a esta restricción se añade la no infrecuente asociación con la alergia a otros alimentos, como por ejemplo la leche, el problema se extiende al plano nutricional (Boyano y cols., 2008).

2.2. Inmunoterapia oral (ITO) con huevo (ITOH)

2.2.1. Concepto y fases de la inmunoterapia oral

Para proveer de un mejor tratamiento de la alergia a los alimentos que el estándar de cuidado actual, la dieta de evitación, están siendo investigadas estrategias terapéuticas activas como la inmunoterapia. La inmunoterapia con alimentos representa un tratamiento etiológico potencial y un salto cualitativo de gran magnitud en el tratamiento de la alergia a los alimentos.

Se pueden distinguir dos tipos de inmunoterapia con alimentos, la específica y la no específica. En la primera, se utiliza el propio alimento responsable de la alergia como tratamiento, y este puede ser administrado por diferentes vías o rutas. Por el momento y en la actualidad, la ruta más utilizada es la oral (Patriarca y cols., 1984, Martorell y cols., 2017), aunque están siendo objeto de estudio otras vías como la sublingual (Narisety y cols., 2015), la epicutánea (Jones y cols., 2017), la subcutánea (Nelson y cols., 1997, Vonk y cols., 2017) y la rectal (Wood y cols., 2013).

En la ITO, también denominada desensibilización o inducción de tolerancia oral, los pacientes consumen cantidades gradualmente crecientes de los alimentos a los que son alérgicos en un intento de inducir cierto nivel de desensibilización. En este estado, el paciente conserva la tolerancia al alimento siempre que mantenga su ingestión regular y esta no sea interrumpida (Bauer y cols., 1999, Martorell y cols., 2002, Nucera y cols., 2004, Staden y cols., 2007).

El esquema básico de este procedimiento terapéutico consta de varias fases (Figura 2):

- Fase de incremento de dosis o de inducción: En esta fase se realiza la escalada o aumento de dosis mediante diferentes tipos de pautas. Se distinguen dos tipos fundamentales: las pautas rápidas, en la que se realizan varios incrementos de dosis por día durante varios días consecutivos durante 1-2 semanas (Pérez-Rangel y cols., 2017), y las pautas lentas o convencionales, en las que los aumentos de dosis se realizan, generalmente, una vez por semana o cada 2 semanas y tienen una duración de varios meses (Patriarca y cols., 2007).
- Fase de mantenimiento: La dosis máxima tolerada en la fase de inducción es administrada regularmente durante un periodo variable de meses a años. En el caso de la ITO con huevo, la dosis de mantenimiento utilizada con más frecuencia es equivalente a un huevo. La frecuencia de administración del alimento puede oscilar de diaria a 2-3 veces/semana (Ibáñez y cols., 2015).

Algunos estudios han analizado la obtención del estado de TP, también denominada tolerancia mantenida o permanente, en el que la tolerancia al alimento se mantiene tras suspender la ITO durante un periodo de tiempo prolongado (Staden y cols., 2007).

Si bien la desensibilización es posible en la mayoría de los pacientes, al plantear una ITO se debe considerar por un lado que el procedimiento conlleva un riesgo significativo de reacciones alérgicas, y por otro, que aún no se ha establecido de manera definitiva su capacidad para inducir tolerancia a largo plazo, lo que supone que la duración del tratamiento es, en principio, indeterminada (Nurmatov y cols., 2017).

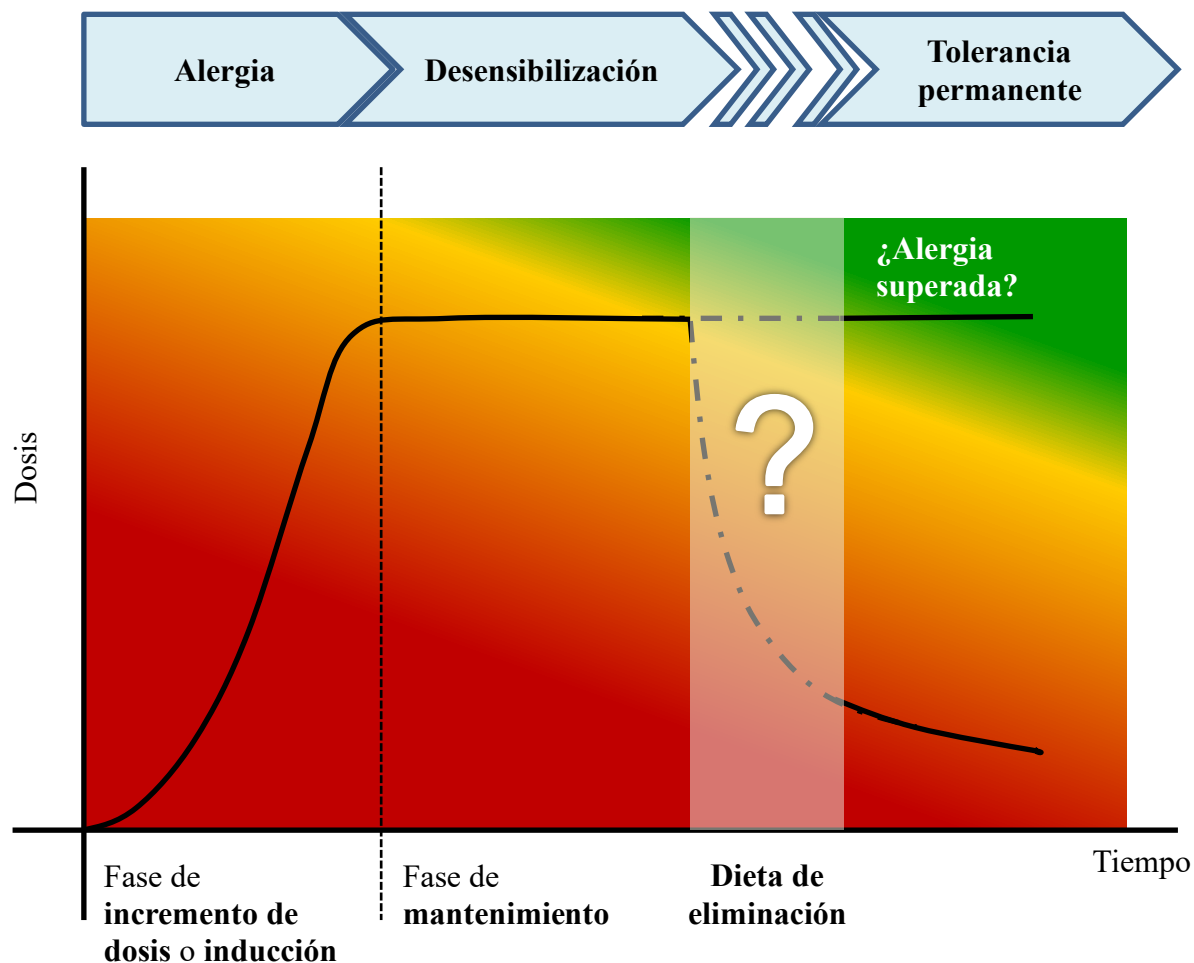


Figura 2. Esquema de las diferentes fases y objetivos de la inmunoterapia oral.

La inmunoterapia no alérgeno específica, tiene por objeto modificar la respuesta alérgica del sistema inmune con independencia de la patología alérgica que padezca el paciente. Con relación a la alergia a los alimentos, tenemos varios ejemplos como los tratamientos biológicos con anti-IgE (Leung y cols., 2003) y otros en fase de investigación como el tratamiento con hierbas medicinales chinas (Srivastava y cols., 2005) y los probióticos (Tang y cols., 2015).

2.2.2. Indicaciones y contraindicaciones de la ITO

La inmunoterapia oral está indicada para el tratamiento de la alergia a proteínas de los alimentos mediada por anticuerpos IgE. El objetivo es cambiar el curso natural de la enfermedad. Se aplica sobre todo en pacientes altamente sensibilizados y con menor probabilidad de resolución espontánea de la enfermedad.

Las principales contraindicaciones del tratamiento son:

- Antecedentes de enfermedad cardiovascular o cualquier enfermedad que contraindique la utilización de adrenalina.
 - Antecedentes de episodio grave o potencialmente mortal de anafilaxia o choque anafiláctico.
 - Antecedentes de enfermedad crónica (que no sea asma, dermatitis atópica, o rinitis alérgica) que sea inestable o esté en riesgo significativo de serlo o requiera un cambio en el régimen terapéutico crónico.
 - Antecedentes de esofagitis eosinofílica.
 - Asma controlada.
 - Uso de betabloqueantes (orales), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, antagonistas de los receptores de la angiotensina o antagonistas de los canales del calcio.
 - Embarazo (durante la fase de inducción).
- Enfermedades malignas, inmunodeficiencias graves.

2.2.3. Mecanismo de acción de la ITO

Los mecanismos por los cuales la ITO induce la desensibilización al alimento, y posiblemente los efectos a más largo plazo, están en proceso de investigación. Los estudios publicados hasta la fecha han demostrado consistentemente ciertos cambios inmunológicos específicos, incluidos el aumento de la IgG₄ específica frente a los alimentos y la disminución

de la respuesta de basófilos y mastocitos (Burks y cols., 2012, Jones y cols., 2009, Vickery y cols., 2014, Gorelik y cols., 2015).

Algunos estudios han mostrado alteraciones en el patrón de unión del antígeno a la IgE específica, ya sea mediante la reducción de la diversidad del reconocimiento de epítomos o la alteración de la afinidad por la IgE (Vickery y cols., 2013).

Además, después de 6-12 meses de iniciarse la ITO, parece haber un cambio de la producción de citoquinas Th2 hacia un perfil proinflamatorio caracterizado por un aumento en la producción de IL-1 β y TNF α (Hofmann y cols., 2009). Este cambio profundo en la respuesta frente al antígeno y la supresión activa de la respuesta inmune se ha visto confirmado por estudios de ITO en los que, por ejemplo, se ha observado un aumento de la función de células reguladoras de CD4 + CD25 + FoxP3 + T específicas de antígeno (Gorelik y cols., 2015, Syed y cols., 2014).

2.2.4. Eficacia clínica de la ITOH

La ITO con alimentos aporta un beneficio sustancial en términos de desensibilización al elevar la dosis umbral de reactividad en pacientes con alergia mediada por IgE (relación de riesgo [RR] = 0,16, intervalo de confianza [IC] del 95%: 0,10-0,26) (Nurmatov y cols., 2017).

En lo que respecta al tratamiento activo de la alergia al huevo, la ITO ha experimentado un gran desarrollo durante los últimos años (García-Rodríguez y cols., 2011, Burks y cols., 2012, Fuentes-Aparicio y cols., 2013, Dello Iacono y cols., 2013, Vázquez-Ortiz y cols., 2014, Caminiti y cols., 2015, Pérez-Rangel y cols., 2017, Martín-Muñoz y cols., 2019). A pesar de que los estudios realizados hasta la fecha son numerosos, solamente la mitad de ellos han sido ensayos controlados (Staden y cols., 2007, Burks y cols., 2012, Meglio y cols., 2013, Dello Iacono y cols., 2013, Fuentes-Aparicio y cols., 2013, Vázquez-Ortiz y cols., 2014, Caminiti y cols., 2015, Pérez-Rangel y cols., 2017, Martín-Muñoz y cols., 2019).

La mayor parte de los ensayos han orientado sus objetivos hacia la eficacia de la ITOH para la obtención del estado de desensibilización al alimento. La interpretación de sus

resultados y la comparación de estos se ve dificultada por las diferencias que presentan en su diseño, objetivos propuestos y poblaciones tratadas (Ibáñez y cols. 2015). La mayor parte de ellos han demostrado el potencial de la ITOH para inducir desensibilización en la mayoría de los estudios. Sin embargo, los rangos de eficacia son extremos entre algunos estudios (del 0% al 100% de los pacientes tratados) (Ibáñez y cols., 2015).

Por otro lado, el tratamiento de ITO, y según el metaanálisis citado anteriormente, sugiere, pero no confirma, que también puede ser beneficioso en términos de TP (RR = 0,29, IC del 95%: 0,08-1,13) (Nurmatov y cols., 2017). En el caso de la ITOH, muy pocos ensayos han analizado la obtención de este estado y el efecto que puede producir sobre la tolerancia la discontinuación de la ITO (Buchanan y cols., 2007, Staden y cols., 2007, Vickery y cols., 2010, Burks y cols., 2012, Caminiti y cols., 2015). Los estudios publicados hasta la fecha indican que entre el 28% y el 75% de los pacientes en los que se suspende el tratamiento de 1 a 3 meses mantienen la tolerancia al alimento (Buchanan y cols., 2007, Staden y cols., 2007, Vickery y cols., 2010, Burks y cols., 2012, Caminiti y cols., 2015).

A la luz de la evidencia, sabemos que aún existen áreas de la ITOH pendientes de dilucidar por completo, como son: las indicaciones del tratamiento, la influencia del tipo de fuente alergénica utilizada en el resultado del procedimiento, la efectividad a largo plazo, el efecto sobre la calidad de vida, la eficiencia de la intervención, los marcadores de riesgo que determinan la probabilidad de RAs y de fracaso, así como los marcadores que puedan predecir el paso de un estado de desensibilización al de TP (Muraro y cols., 2018). Todo ello contribuye a mantener vivo el debate entre sociedades científicas sobre si la inmunoterapia con alimentos debe ser realizada solamente por centros de investigación o centros clínicos con amplia experiencia en este procedimiento terapéutico (Muraro y cols., 2018), o bien, incorporada ya en la práctica clínica siguiendo las guías de consenso (Martorell y cols., 2017).

2.2.5. Seguridad de la ITOH

Los metaanálisis revelan que la ITO está asociada a un aumento moderado del riesgo de RAs sistémicas graves y a un aumento sustancial de las RAs locales menores. Las RAs representan

la mayor limitación del tratamiento, siendo la principal causa de su fracaso en algunos pacientes (Nurmatov y cols., 2017).

Uno de los obstáculos al análisis de las RAs es la variabilidad existente en su notificación (Ibáñez y cols., 2015). El análisis es complejo, ya que no existe consenso sobre cómo clasificar e informar de las reacciones en función de su gravedad. Las clasificaciones utilizadas con mayor frecuencia son las de Sampson y cols. (Sampson y cols., 2003) y la de Clark y Ewans (Clark y cols., 2004), basadas en la gravedad de estas. Los autores de los estudios de ITOH informan en ocasiones del porcentaje de pacientes con reacciones, en otras, también del porcentaje de reacciones en comparación con el número total de dosis de tratamiento administradas, o incluso, y como un indicador de gravedad, del número de pacientes que han precisado la administración de adrenalina durante el procedimiento, aunque sin definir previamente los criterios seguidos para su uso (Longo y cols., 2008, Martorell y cols., 2017).

Los ensayos publicados revelan que las RAs durante la ITOH afectan a un porcentaje significativo de pacientes (50-100%) y que estas tienden a ser frecuentes (5,9-25% de las dosis administradas), aunque su gravedad suele ser de leve a moderada (Ibáñez 2015). De los datos publicados se deduce que los niveles elevados de IgE específica basales pueden predecir el riesgo de RAs durante el procedimiento (Vázquez-Ortiz y cols., 2013, Pérez-Rangel y cols., 2017).

Sin embargo, pueden producirse reacciones graves como la anafilaxia o la esofagitis eosinofílica. Desde el primer informe de esofagitis eosinofílica inducida por ITOH (Ridolo y cols., 2012), la notificación de nuevos casos asociados a ITO se ha sucedido a lo largo de los años (Sánchez-García y cols., 2012, Fuentes-Aparicio y cols., 2013). Según el único metaanálisis que ha investigado hasta el momento la relación entre ITO y esofagitis eosinofílica, la incidencia general de esofagitis eosinofílica durante la ITO sería del 2,7%, cifra que se elevaría al 3,5% si solo se tuviesen en cuenta para el análisis los estudios de mayor calidad. A pesar del riesgo de esofagitis eosinofílica durante la ITO, su resolución, clínica e histológica, se produce en la práctica totalidad de los casos tras la interrupción de la ITO (Lucendo y cols., 2014).

Por último, durante los tratamientos de ITO deben ser considerados ciertos factores que pueden ser facilitadores de RAs como: ejercicio físico, antiinflamatorios no esteroideos, estrés, ayuno, decúbito y menstruación, entre los más frecuentes (Vázquez-Ortiz y cols., 2013).

2.2.6. Modulación de la respuesta inmunológica por la ITOH

La evaluación de los cambios inmunológicos que se suceden durante el tratamiento de inmunoterapia oral se ve dificultada por las diferencias existentes entre los estudios publicados con relación a diversos factores: niveles basales de IgE específica, umbrales de tolerancia basales, fuentes alérgicas utilizadas durante la ITOH, protocolos de desensibilización, dosis de mantenimiento, y criterios y herramientas para evaluar el éxito del tratamiento.

Los principales cambios que se suceden a lo largo del tratamiento de ITOH en los pacientes respondedores, incluyen:

- Durante los primeros meses (Burks y cols., 2012, Ibáñez y cols., 2015):
 - Disminución del tamaño de la pápula frente a los alérgenos del huevo en la prueba cutánea.
 - Incremento inicial de los niveles de IgE sérica específica seguido de una disminución progresiva de los mismos.
 - Aumento progresivo de los niveles de IgG₄ específica.
 - Disminución en la activación de basófilos *ex vivo* tras estimulación con el alérgeno.
- A partir de los 6 meses:
 - Cambios en las respuestas y poblaciones de las células T como aumento de IL-10, cambios en los niveles de citoquinas pasando de un perfil Th2 a uno Th1, anergia clonal, disminución de las T efectoras antígeno específicas y supresión inmune por células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Fuentes-Aparicio y cols., 2012).

2.2.7. Productos de huevo utilizados para ITOH

Una de las particularidades de la ITOH es el amplio abanico de fuentes alergénicas que han sido utilizadas por los diferentes grupos investigadores para desarrollar el procedimiento. Este hecho dificulta en numerosas ocasiones la valoración de los resultados entre los diferentes estudios y, en consecuencia, la elección de la fuente más idónea para realizar el tratamiento.

La Tabla 2 resume los tipos de productos de huevo que han sido utilizados hasta la fecha.

Tabla 2. Fuentes alergénicas utilizadas en los tratamientos de ITOH (Ibáñez y cols., 2015).

Extracto	Equivalencia con la fuente natural según los autores	% de proteína del producto (peso)	Sistema de producción	Referencias
Huevo natural completo*	100%	13%	NN	Crudo: Patriarca 2007, Meglio 2012, Dello Iacono 2012 Cocido: Morisset 2007, Itoh 2010, García-Rodríguez 2011
Clara de huevo natural	Representa el 70% del peso comestible de un huevo	10,2%	NN	No utilizada para ITOH
Yema de huevo natural	Representa el 30% del peso comestible de un huevo	16,1%	NN	No utilizada para ITOH
Huevo completo líquido pasteurizado	45 ml equivalen a 1 huevo (no se especifica tamaño)	11,5%	64,5°C durante 150 segundos	Ojeda 2012
Clara de huevo líquida pasteurizada	Cada 1 ml de producto contiene 83 mg de proteína de clara de huevo	10,7%	57°C durante 180 segundos (de acuerdo con Jurado-Palomo 2010)	Vázquez-Ortiz 2014, Tortajada 2012, Martín-Muñoz 2019
	1 huevo = 30 ml de clara de huevo	NR	57°C durante 385 segundos	García-Rodríguez 2011

Huevo liofilizado	5600 mg de proteína de clara de huevo liofilizada equivale a 1 huevo	NR	Huevo liofilizado: congelar el huevo y luego reducir la presión alrededor para permitir que el agua congelada del huevo sublime directamente desde la fase sólida hasta la fase gaseosa, dejando un material sólido**	Staden 2007
Huevo completo pasteurizado deshidratado	10 g de extracto = 1 huevo	NR	NR	Fuentes-Aparicio 2013
Clara de huevo deshidratada***	1 g de huevo en polvo equivale a 8 g de clara de huevo cruda	NR	NR	Itoh 2010
Clara de huevo pasteurizada deshidratada*	3600 mg de CHD equivalen a la clara de un huevo fresco	78%	La clara de huevo se pasteuriza (59°C durante 6 minutos), luego, el pH se ajusta a 6,5–7,5 mediante la adición de ácido cítrico. Luego se agregan glucosa oxidante, catalasa y peróxido de hidrógeno para eliminar la glucosa y prevenir la reacción de Maillard. Finalmente, se pasa a través de una torre de pulverización donde se seca con aire caliente a 80°C durante 1 minuto.	Ruiz García 2012
	2 g de clara de huevo en polvo = 1/3 de huevo	80% del peso son proteínas	NR	Buchanan 2007, Vickery 2010, Burcks 2012
	4000 mg of CHD es equivalente a la clara de un huevo fresco	NR	La clara de huevo se pasteuriza y luego se pasa por una torre de aspersión donde se seca.	Caminiti 2015

* La cantidad de proteínas varía según el peso del huevo, puede variar desde 53 g para un tamaño pequeño hasta más de 73 g para un tamaño XXL.

** Datos no facilitados por los autores, explicación incluida para mejorar la comprensión.

*** Probablemente pasteurizada y deshidratada, pero no especificado en la publicación.

ITOH, inmunoterapia oral con huevo; **CHD**, clara de huevo deshidratada; **NR**, no reportado; **NN**, no necesario.

2.2.8. La ITOH en términos de tolerancia permanente o falta de respuesta mantenida

El objetivo último de la ITO con alimentos es la obtención del estado de TP (Ibáñez y cols., 2015).

Pocos estudios han analizado la capacidad de la ITOH para inducir una TP tras la suspensión del tratamiento. En dichos ensayos, los pacientes que han sido desensibilizados con éxito siguen una PEOC con huevo tras suspender el tratamiento de ITO durante un periodo de varias semanas o meses. Si la prueba resulta negativa, se determina que el paciente ha alcanzado la TP.

La mayoría de los estudios han utilizado empíricamente periodos de evitación que oscilan entre los 1 y 2 meses (Burks y cols. 2012, Staden y cols., 2007, Vickery y cols., 2010). Solamente en dos estudios, el periodo de evitación se prolongó durante 3-4 meses (Buchanan y cols., 2007, Caminiti y cols., 2015). Este hecho puede resultar trascendental, ya que se desconoce si periodos de evitación más extensos podrían afectar a la tolerancia del alimento (Syed y cols., 2014).

Staden y cols. (Staden y cols., 2007) estudió a un grupo de pacientes de 0,6-12,9 años (edad media 2,5 años) que recibió ITOH durante un promedio de 21 meses en un ensayo controlado. Posteriormente, los pacientes siguieron 2 meses de dieta de evitación antes de someterse a una PODCCP. El 36% de los pacientes superó la prueba. Sin embargo, un porcentaje similar (35%) del grupo de control también superó la prueba tras mantener la evitación del huevo durante todo estudio, es decir, habían superado su alergia espontáneamente. Por lo tanto, no se observaron diferencias significativas entre el grupo activo y el grupo control en cuanto a la eficacia de la ITOH para obtener el estado de TP al huevo.

Buchanan y cols. (Buchanan y cols., 2007) en un estudio no controlado, demostraron que el 57% (4/7) de los pacientes que recibieron ITOH con dosis bajas de huevo (300 mg de proteína/día) superaban una PODCCP con 8 g de proteína de huevo después de 24 meses de tratamiento. El 28,5% (2/7) de ellos alcanzaron la TP tras superar una segunda PODCCP realizada 3-4 meses después de haber suspendido la ITOH.

Vickery y cols. (Vickery y cols., 2010) en otro estudio no controlado, demostraron que el 75% (6/8) de los pacientes que participaron y que fueron tratados con una dosis media de 2050 mg de proteína de huevo durante una media de 33,8 meses, pasaron una PODCCP después de seguir dieta de evitación durante 1 mes.

Burks y cols. (Burks y cols., 2012) observaron en un ensayo controlado con placebo, que de los 30 pacientes que toleraron 10 g de clara de huevo en una PODCCP a los 22 meses de iniciar el tratamiento, 11 (el 28% del grupo total de ITO [40 pacientes]) alcanzaban la TP tras superar una segunda PODCCP de huevo realizada 4-6 semanas después de haber seguido dieta de exclusión de huevo. A los 30 y 36 meses del comienzo de la ITO, todos los pacientes que habían pasado esta última PODCCP continuaron consumiendo huevo sin presentar reacciones adversas. Se observó además que, a los 22 meses del comienzo de la ITO, el tamaño del habón de la prueba cutánea para huevo era inversamente proporcional y los niveles de IgG₄ para huevo eran directamente proporcionales a la probabilidad de alcanzar la TP. Sin embargo, no se demostró ninguna correlación entre los niveles de IgE sérica para huevo o la activación de basófilos a los 22 meses de tratamiento y el resultado de la PODCCP a los 24 meses, tras 4-6 semanas de dieta de evitación.

Caminiti y cols. (Caminiti y cols., 2015) demostraron que el 29% (5/17) de los pacientes desensibilizados pasaron una PODCCP después de 10 meses de ITOH y 3 meses de dieta de evitación de huevo.

En resumen, los estudios reflejan que alrededor del 30% los pacientes que siguen un tratamiento de ITOH pueden obtener el estado de TP. Solo en un estudio el 75% de los pacientes alcanzaron la TP, pero debe advertirse que en el mismo solamente fueron incluidos 7 pacientes y que el tratamiento de ITOH se prolongó durante más de 3 años. En los estudios descritos la duración del tratamiento se prolongó entre 10 y 34 meses. Por tanto, una de las cuestiones que se nos plantea es la influencia de la duración del tratamiento en la eficacia de la ITOH.

La hipótesis que motiva este estudio es saber si un tratamiento de ITOH de corta duración puede contribuir a la obtención de la TP.

2.2.9. Beneficios y debilidades de la inmunoterapia oral con huevo

La ITOH ha demostrado ser eficaz para incrementar la dosis umbral de alérgeno y aportar al paciente un elevado grado de desensibilización, siempre que las dosis de tratamiento sean ingeridas regularmente. Por otro lado, pero a falta de un mayor número de estudios que consoliden la evidencia actual, la ITO aporta beneficios en términos nutricionales y de calidad de vida, diversificando la dieta del paciente, reduciendo el riesgo de reacciones alérgicas tras contactos accidentales con el alimento, reduciendo las restricciones sociales derivadas de la obligada evitación del alimento, y reduciendo el impacto emocional y la ansiedad causadas por las limitaciones dietéticas que implica esta medida (Pajno y cols., 2018).

Sin embargo, y como se ha descrito anteriormente, el procedimiento tiene limitaciones y aspectos en los que el conocimiento es aun escaso (Vázquez-Ortiz y cols., 2016). En base a lo publicado hasta el momento, a continuación, quedan expuestos, de manera sintética, algunos aspectos de la ITOH que quedan por determinar:

Indicaciones

- Falta de consenso.

Eficacia

- Falta de una definición consensuada de eficacia en términos de desensibilización y TP.
- Cómo debe medirse la eficacia: mediante la superación de una PEOC tras la ITO, o tras alcanzar la tolerancia de determinada dosis de alérgeno durante la misma.
- Escasos datos de eficacia a largo plazo.

Seguridad

- Frecuencia de RAs, y posibilidad de RAs graves.
- Seguridad a corto plazo y escaso conocimiento de la seguridad a largo plazo.

- Marcadores que permitan conocer a priori el riesgo de que se produzcan RAs y el riesgo de que la ITO fracase.

Fuente alérgica

- Influencia del tipo de fuente alérgica en el resultado del procedimiento.

Procedimiento

- Protocolos no consensuados de fase de incremento de dosis para los pacientes con diferentes perfiles.
- Falta de consenso en el régimen óptimo de la toma de huevo durante la fase de mantenimiento y las presentaciones en las que es recomendable tomar el alimento.
- Ausencia de criterios que definan cómo debe modificarse la pauta de ITOH en función de las RAs que se produzcan.
- En qué momento debe valorarse suspender el tratamiento por la gravedad y frecuencia de estas RAs.

Tolerancia permanente o falta de respuesta mantenida

- Criterios que determinen si debe confirmarse la obtención del estado de TP, y en su caso, qué indicadores deben ser considerados.
- Cuál debe ser la duración mínima de la dieta de evitación previa a la prueba de exposición.
- Cuál debe ser el régimen de consumo de huevo tras haber confirmado este estado.
- Cuál es la probabilidad de reacciones durante el periodo posterior a la obtención de este estado.
- Marcadores que permitan predecir el paso del estado de desensibilización al de TP.

Adherencia y cumplimiento

- Estrategias para mejorar la adherencia.
- Implicaciones en la seguridad, mantenimiento del estado de desensibilización y consecución del objetivo de TP.

Aval de las Sociedades Científicas

- Respaldo de las guías para ITO con alimentos que avalen el uso del procedimiento en la práctica clínica más allá del ámbito de la investigación.

Calidad de vida relacionada con la salud

- Efecto de la ITO en la calidad de vida relacionada con la salud de los pacientes, padres y cuidadores.

Evaluación económica

- Análisis bidireccional de las implicaciones económicas de la intervención. Por un lado, de los costes necesarios para la realización del procedimiento en términos de recursos sanitarios, y por otro, el ahorro de costes (en términos del beneficio) que puede representar la ITO en cuando a la resolución de la patología para el paciente, y en beneficio indirecto para sus padres y cuidadores.

Todos estos aspectos representan en sí mismos, objetivos de investigación presente y futura.

De ellos, una de las áreas más desconocidas, y al tiempo más importantes en el conocimiento de la ITOH, es su capacidad para inducir TP.

3

Justificación del estudio, Hipótesis de trabajo, Objetivos y Aplicabilidad

3.1. Justificación de estudio

La alergia al huevo es una de las patologías alérgicas más prevalentes entre la población infantil. El impacto que ocasiona sobre la CVRS del paciente afecta a los planos nutricional, social y psicológico, y se extiende negativamente sobre la calidad de vida de sus familias. Todo ello exige buscar y desarrollar herramientas de diagnóstico más precisas y tratamientos más seguros y eficaces que contribuyan a invertir esta situación.

A lo largo de los apartados anteriores se ha señalado la importancia de la elección de la fuente alergénica en la PEOC con huevo. Con relación a esta última y de acuerdo con la normativa vigente, el uso de ovoproductos será obligado cuando se decida exponer al paciente al huevo en su forma cruda. Hasta el momento se conocía que la alergenicidad del huevo pasteurizado no estaba afectada por el tratamiento térmico que requiere el proceso (Jurado-Palomo y cols., 2010). Sin embargo, desconocíamos si ocurría lo mismo tras someter al producto a un segundo tratamiento térmico, la deshidratación.

La dieta de evitación supone una actitud expectante y pasiva en el tratamiento de la alergia persistente a los alimentos. Los estudios publicados hasta la fecha, y la evidencia que de ellos se extrae, han demostrado que la ITOH con protocolos de larga duración aporta un beneficio sustancial en términos de desensibilización (Nurmatov y cols., 2017). No se tienen datos suficientes sobre la eficacia y seguridad de protocolos más cortos que facilitarían la realización del procedimiento. Además, los datos sobre su eficacia en términos de TP son muy limitados y solamente han sido medidos tras periodos prolongados de tratamiento. Hasta la fecha se desconocen los factores que pueden determinar e informar sobre el momento en el que se produce la transición de un estado de desensibilización al de TP.

Existe cierta evidencia de que durante la ITOH acontece un cambio profundo en la respuesta del sistema inmune frente al alérgeno, que se traduce en un cambio en la producción de citoquinas Th2 hacia un perfil de citoquinas proinflamatorio Th1. Sin embargo, hay escasos datos sobre en qué momento del tratamiento de ITOH se produce la normalización en el balance de citoquinas, y si su análisis pudiera servir como herramienta predictora de éxito del tratamiento.

Por último, existen lagunas en el conocimiento de la efectividad y la seguridad de la ITOH a largo plazo, así como en aspectos relativos a la adherencia al tratamiento y los cambios en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares.

3.2. Hipótesis de trabajo

La clara de huevo deshidratada podría ser una fuente alérgica eficaz, similar a la clara cruda, para el diagnóstico de la alergia al huevo mediante la prueba de exposición oral controlada y para su tratamiento mediante inmunoterapia oral.

Un protocolo de inmunoterapia oral con huevo de corta duración podría ser seguro para el tratamiento de la alergia al huevo y eficaz para:

- Inducir desensibilización y tolerancia permanente a corto plazo.
- Inducir cambios inmunológicos específicos sobre las respuestas Th1 y Th2.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo principal

- Analizar la seguridad y la eficacia de un protocolo de ITOH de corta duración para inducir tolerancia permanente* a corto (4 meses) y medio plazo (19 meses) en niños y adolescentes con alergia persistente al huevo .

3.3.2. Objetivos secundarios

- Estudiar la alergenidad de una CHD para su utilización en el diagnóstico y tratamiento de alergia a huevo.
- Analizar la seguridad y la eficacia de un protocolo de ITOH de corta duración para inducir desensibilización** a corto (3 meses), medio (18 meses) y largo plazo (7 años) en niños

y adolescentes con alergia persistente al huevo.

- Estudiar los cambios en el umbral de tolerancia en la PODCCP tras suspender la ITOH en aquellos pacientes que no alcancen la TP.
- Analizar los cambios en el tamaño de la prueba cutánea y los niveles de IgE e IgG₄ sérica específica frente a las fracciones del huevo, y los cambios en los niveles séricos de citoquinas Th1 y TH2 de pacientes que reciben ITOH.
- Estudiar la relación entre las diferentes respuestas clínicas a la ITOH y los parámetros inmunológicos.
- Detectar posibles predictores individuales para desarrollar TP.
- Describir la situación clínica y los hábitos de alimentación a los 7 años de la ITOH.

* Se definió tolerancia permanente como la capacidad de consumir 2808 mg de proteína de clara de huevo sin presentar síntomas en una PODCCP realizada un mes después de finalizar la ITOH y haber seguido durante ese periodo una dieta exenta de huevo.

** Se definió desensibilización como la capacidad del paciente para comer al menos un huevo poco cocinado (huevo frito, tortilla poco cocinada o huevo revuelto) cada 48 horas sin presentar RAs.

3.4. Aplicabilidad y utilidad práctica

- Protocolo de ITOH de corta duración, efectivo y seguro en el tratamiento de la alergia a huevo que reduciría la fase de incremento de dosis ofreciendo una elevada tasa de desensibilización.
- La utilización de la CHD para el diagnóstico y tratamiento de la alergia al huevo ofrecería seguridad microbiológica, permitiendo administrar al paciente dosis precisas del alimento.
- La identificación de biomarcador/es para la monitorización de la eficacia, del riesgo de

RAs y de la obtención de estado de TP durante la ITOH, aportaría seguridad y rentabilidad al procedimiento en términos de consumo de recursos.

4

Metodología

4.1. Diseño del estudio y ética

El estudio del análisis de la alergenidad de la CHD fue prospectivo y abierto. El ensayo clínico que analizó la seguridad y eficacia de un tratamiento de ITOH fue un estudio prospectivo, abierto, de grupos paralelos, aleatorizado y controlado.

Ambos estudios, incluidos sus protocolos y formularios de consentimiento, fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid (código interno R-0007/11).

Los pacientes fueron reclutados de forma prospectiva en la Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid.

Los padres o tutores firmaron el consentimiento informado de acuerdo con las directrices éticas de la Institución para la investigación en pacientes. Los pacientes mayores de 11 años firmaron además un consentimiento informado para autorizar su participación en el estudio (Anexo I).

El doctorando asegura la precisión de los datos y el análisis, así como el cumplimiento del protocolo establecido.

4.2. Centros de trabajo y financiación

La intervención clínica se llevó a cabo en el Hospital de Día de la Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús.

La investigación *in vitro* se realizó en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y en los Laboratorios del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

Parte del proyecto de investigación, la correspondiente al análisis en suero de citoquinas Th1 y Th2, fue financiado con una ayuda a la investigación de la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC). El resto del proyecto no

recibió otras fuentes de financiación.

4.3. Participantes

4.3.1. Estudio de la alergenidad de la CHD

Los criterios de inclusión en la selección de pacientes para el análisis de la alergenidad de la CHD y de su eficacia en el diagnóstico de la alergia al huevo fueron:

- Pacientes con edades comprendidas entre los 2 y 17 años de ambos sexos.
- Historia clara de síntomas inmediatos tras de la ingestión de huevo.
- Pruebas cutáneas intraepidérmicas (PC) positivas y/o IgE sérica específica (sIgE) (ImmunoCAP, Phadia) para clara de huevo (sIgE-C), OVM (sIgE-OVM) y/o OVA (sIgE-OVA).
- Aceptación del consentimiento informado por escrito.

Los criterios de exclusión para la selección de pacientes fueron:

- Shock anafiláctico tras la ingestión de huevo.
- RAs al huevo no mediadas por IgE.
- Enfermedades malignas, inmunopatologías y/o inmunodeficiencias primarias o secundarias graves.
- Patologías asociadas que contraindicasen el uso de adrenalina.

4.3.2. Ensayo clínico sobre la seguridad y eficacia del tratamiento de ITOH

Para investigar la seguridad y la eficacia del tratamiento con ITOH para obtener la TP en comparación con la dieta de evitación de huevo, se realizó un ensayo clínico controlado y aleatorizado en un grupo de pacientes diferente al que participó en el estudio de la alergenidad de la CHD.

Se invitó a participar a pacientes mayores de 5 años de edad diagnosticados de alergia a huevo que acudían consecutivamente a la Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Anexo II).

Los criterios de inclusión para la selección de pacientes fueron:

- Edad: mayor o igual de 5 años y menor de 18 años.
- Alergia a proteínas de huevo mediada por IgE, cumpliendo los siguientes criterios diagnósticos:
 - Reacciones inmediatas tras la ingestión de huevo con manifestaciones cutáneas (eritema, urticaria y/o angioedema), digestivas (vómitos y/o diarrea aguda) y/o respiratorias (rinitis y/o broncoespasmo) en las 2 primeras horas tras la ingestión de huevo.
- Realizado en las 4 semanas previas a la ITOH:
 - $PC \geq 3$ mm e IgE específica $> 0,70$ KU/l para huevo completo o alguna de sus fracciones.
 - PODCCP positiva.
- Aceptación del consentimiento informado por escrito.

Los criterios de exclusión para la selección de pacientes fueron:

- Antecedentes de anafilaxia extremadamente grave tras el consumo de huevo (por ejemplo, hipoxia, hipotensión y/o pérdida del conocimiento).
- RAs a huevo no relacionadas con IgE.
- Esofagitis eosinofílica.
- Enfermedades malignas.
- Enfermedades autoinmunes y eficiencias inmunológicas graves.
- Cualquier referencia a una enfermedad que contraindicase el uso de adrenalina.
- Hipersensibilidad a cualquier componente del placebo usado para la PODCCP.
- Padres no colaboradores, no firma del consentimiento informado.

4.4. Generación de los grupos, tiempos de estudio e intervenciones

4.4.1. Aleatorización y generación de los grupos

Los participantes fueron asignados a los grupos de estudio en una proporción de 1:1 usando una tabla de aleatorización generada por ordenador.

Para las intervenciones del estudio fueron generados los siguientes grupos (Figura 3) (Anexo III):

- Grupo de intervención (GI): Pacientes que iban a ser sometidos a ITOH durante 3 meses, seguido de una dieta de evitación de huevo durante 1 mes y una posterior PODCCP con huevo.
- Grupo de control (GC): Pacientes que tenían que continuar con la dieta de evitación de huevo durante 4 meses. Tras la dieta de evitación fueron sometidos a una PODCCP con huevo.
- Grupo de intervención 2 (GI2): Pacientes del GI y del GC que no superaron la PODCCP a los 4 meses de iniciar el estudio y que posteriormente recibieron ITOH durante 18 meses seguida de una dieta de evitación de huevo durante 1 mes. Tras la dieta de evitación fueron sometidos a una PODCCP.

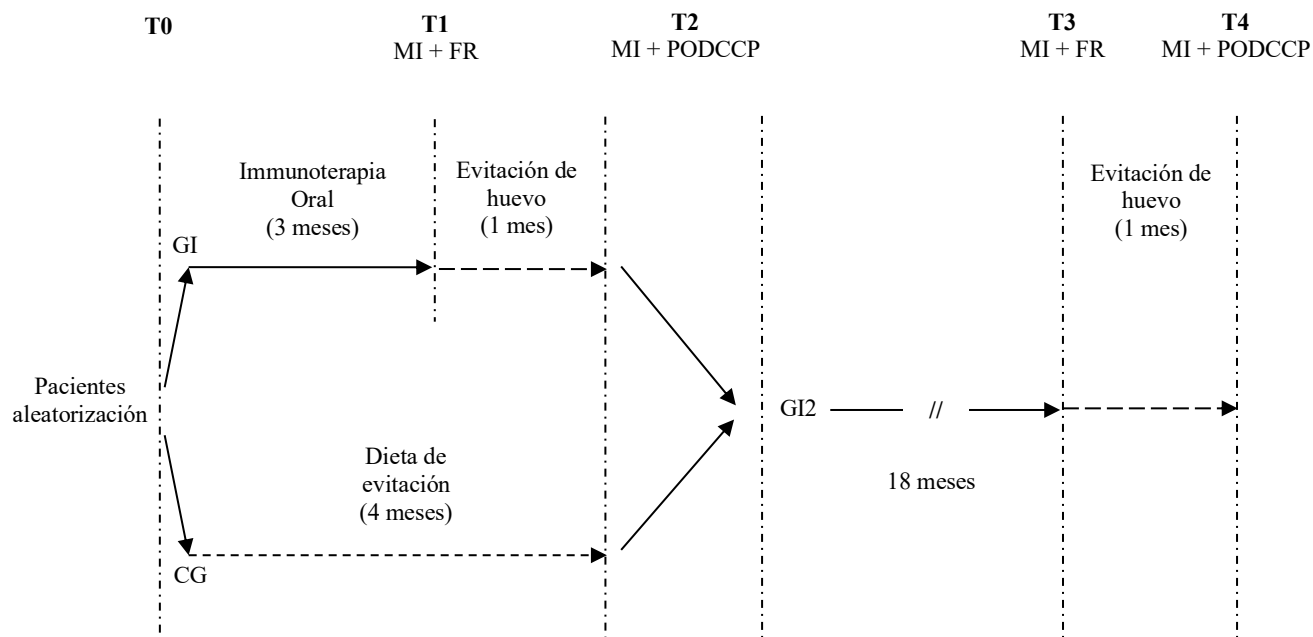


Figura 3. Esquema de los grupos del estudio e intervenciones en los diferentes tiempos. **T0**, basal; **T1**, 3 meses después de comenzar la ITOH; **T2**, 4 meses después del inicio del estudio; **MI**, marcadores inmunológicos (pruebas cutáneas, sIgE y sIgG4); **PODCCP**, prueba de exposición oral doble ciego controlada con placebo; **GI**, grupo de intervención; **GI2**, grupo de intervención 2; **GC**, grupo control; **FR**, formularios de registro (cumplimiento de la ITOH y registro de reacciones adversas). Se registraron las reacciones adversas relacionadas con la ingestión de huevo, la frecuencia, la presentación y la cantidad de ingesta de huevo y se analizaron los marcadores inmunológicos cada 6 meses.

4.4.2. Tiempos de análisis e intervenciones

Los tiempos de análisis e intervenciones por grupos del estudio fueron los siguientes (Figura 3):

- Grupo de intervención:
 - T0: Inclusión en el estudio e inicio de la ITOH.
 - T1: A los 3 meses de T0. Suspensión de la ITOH.
 - T2: A los 4 meses de T0. Los pacientes eran sometidos a PODCCP con CHD.

- Grupo de control:
 - T0: Inclusión en el estudio y continuación de la dieta de evitación de huevo.
 - T2: A los 4 meses de T0. Los pacientes eran sometidos a PODCCP con CHD.
- Grupo de intervención 2:
 - T2: Inicio de la ITOH.
 - T3: A los 18 meses de T2. Suspensión de la ITOH.
 - T4: A los 19 meses de T2. Los pacientes eran sometidos a PODCCP con CHD.

Los tiempos de análisis de los pacientes a lo largo del ensayo fueron los siguientes:

- T0: Inclusión en el estudio.
- T1: A los 3 meses de T0. Suspensión de la ITOH en GI, continuación de la dieta de evitación en GC.
- T2: A los 4 meses de T0. Los pacientes del GI y GC eran sometidos a PODCCP con CHD. Inicio de la ITOH en GI2, formado por los pacientes del GI y GC que no superaban la PODCCP.
- T3: A los 18 meses de T2. Suspensión de la ITOH en GI2.
- T4: A los 19 meses de T2. Los pacientes del GI2 eran sometidos a PODCCP con CHD.
- T5: A los 7 años de T0. Evaluación de la eficacia, seguridad y parámetros inmunológicos durante los años de seguimiento de todos los pacientes incluidos en el ensayo. Cuestionarios telefónicos.

Se siguió un calendario de actuación para los diferentes tiempos del estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Calendario de actividades y evaluaciones para cada grupo de intervención y tiempo de estudio.

	Tiempo de estudio								
	T0		T1		T2		T3	T4	T5
Grupo de intervención	GI	GC	GI	GC	GI	GC	GI2	GI2	GI+GI2
Historia clínica y datos demográficos	X	X							
Exploración física	X	X	X		X	X	X	X	
PC huevo*	X	X	X		X	X	X	X	X
IgE total	X	X	X		X	X	X	X	X
IgE e IgG ₄ específicas*	X	X	X		X	X	X	X	X
PODCCP huevo	X	X			X	X		X	
Inicio de la dieta de exclusión			X				X		
Registro de RAs en ITOH			X				X	X	X
Citoquinas†	X		X						
Cuestionario telefónico									X

* Las PC y las determinaciones de IgE e IgG₄ específicas se realizaron cada 6 meses durante los dos primeros años desde el inicio de la ITOH y cada año a partir del tercer año del inicio de la ITOH en los pacientes del GI que alcanzaron la tolerancia permanente y en todos los pacientes del GI2.

† Las determinaciones de citoquinas Th1 y Th2 en suero se realizaron en un grupo seleccionado de pacientes del GI, antes de la ITOH (T0) y a los 3 (T1), 12 y 18 meses de su inicio.

GI, grupo de intervención; **GI2**, grupo de intervención 2; **GC**, grupo control; **ITOH**, inmunoterapia oral con huevo; **PODCCP**, prueba de exposición oral con huevo doble ciego controlada con placebo; **RAs**, reacciones adversas.

En la primera parte del estudio (T0 a T2) se compararon GI y GC con el objetivo de determinar el efecto de la intervención terapéutica.

En la segunda parte del estudio (T2 a T4), se analizaron las variables del GI2 con objeto de determinar los cambios intragrupo durante la ITOH.

En la Tabla 4 se detalla la población analizada por cada objetivo planteado en el estudio.

Tabla 4. Población analizada por cada objetivo del estudio.

Objetivo principal	Objetivos secundarios
Eficacia en TP	Eficacia y seguridad en desensibilización
GI versus GC en T2	GI en T1
GI2 en T4	GI2 en T3
GI+GI2 en T5	
	Cambios en el umbral de tolerancia
	GI en T2
	GI2 en T4
	Cambios inmunológicos
	GI en T1 y T2; GI2 en T3 y T4
	Predictores para desarrollar TP
	GI en T1
	Situación clínica y hábitos de alimentación a los 7 años de la ITOH
	GI + GI2

GI, grupo de intervención; **GI2**, grupo de intervención 2; **GC**, grupo control.

4.5. Datos demográficos y antecedentes clínicos

La historia clínica recogió los datos demográficos como: sexo, edad y residencia (Anexo IV).

Se recogió información detallada sobre los antecedentes personales y familiares:

- Antecedentes personales de alergia: dermatitis atópica, urticaria/angioedema, rinoconjuntivitis, asma, sensibilización a aeroalérgenos y alergia a alimentos.
- Antecedentes personales de enfermedades no alérgicas, así como la toma de medicamentos.
- Antecedentes familiares de alergia en primer grado.

Se recogieron datos relacionados con la alergia al huevo:

- Edad de introducción del huevo.
- Orden de introducción de las diferentes partes del huevo.
- Edad de la primera RA.
- Tolerancia previa o síntomas tras la primera toma de huevo.
- Periodo de latencia entre la toma y la aparición de síntomas.
- Síntomas presentados en la primera RA.
- RAs por exposiciones accidentales.
- Antecedentes de anafilaxia por huevo.
- Fecha de la última RA tras la ingestión de huevo.

A todos los pacientes les fue realizada una exploración física general y específica por aparatos.

Los datos de cada paciente fueron recogidos en una base Excel anonimizada que cumplía con la normativa de la ley de protección de datos. Cada paciente fue identificado mediante un código interno formado por letras y números.

4.6. Fuente alérgica: Clara de huevo deshidratada

La CHD utilizada está disponible comercialmente y se obtuvo directamente del productor (Albúmina de huevo en polvo, OVOSEC S.A., Valladolid, España). El producto está hecho de clara de huevos de la especie *Gallus gallus domesticus*. La CHD está pasteurizada, calentada a 59°C durante 6 minutos, para erradicar cualquier microorganismo (*Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, levadura y mohos) de acuerdo con los criterios de higiene del proceso y seguridad alimentaria del Reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas N° 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, sobre criterios microbiológicos para los productos alimenticios (Comission Regulation 2005). Tras la pasteurización, el pH se ajusta a 6,5-7,5 mediante la adición de ácido cítrico. Luego se agregan glucosa oxidante, catalasa y peróxido de hidrógeno para eliminar la glucosa y prevenir la reacción de Maillard. Finalmente, la clara de huevo pasteurizada se pasa a través de una torre de pulverización donde se deshidrata con aire caliente a 80 °C durante 1 minuto.

La CHD resultante se puede almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 18 meses después de su producción. El contenido de proteína de la CHD es del 78%. Según el fabricante, 3600 mg de CHD es el equivalente a la clara de huevo contenida en un huevo fresco de tamaño pequeño. La CHD se diluye fácilmente en un líquido a temperatura ambiente para proporcionar una mezcla homogénea fácilmente administrable.

4.7. Procedimientos *in vivo*

4.7.1. Pruebas cutáneas

Las PC se realizaron mediante la técnica de prueba intraepidérmicas o *prick* de acuerdo con las recomendaciones de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI 1993) con extractos comerciales de clara de huevo (1 mg / ml), OVA (1 mg / ml) y OVM (1 mg / ml) (Leti, Madrid, España). Se preparó un extracto de CHD diluyendo 3600 mg de CHD en 43 ml de solución salina (84 mg/ml) para obtener una concentración de proteína similar a la contenida en una CHC (Dreborg y cols., 1983). Se realizaron a cada paciente PC con el extracto

de CHD y prick-prick con CHC con el objetivo de comparar el resultado de ambas pruebas. Las PC se realizaron en la superficie volar del antebrazo con lancetas de ALK (ALK Abelló, Madrid, España). El fosfato de histamina a 10 mg/ml y la solución salina normal se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. La respuesta se leyó 15 minutos después de la punción, y los resultados se expresaron como el diámetro medio de la roncha (mm). Un diámetro de habón de 3 mm o más en comparación con el control de solución salina se definió como una reacción positiva.

4.7.2. Pruebas de exposición oral controlada

4.7.2.1. Prueba de exposición oral abierta con clara de huevo cruda y clara de huevo deshidratada

Los pacientes seleccionados para realizar el análisis de la alergenidad de la CHD y de su eficacia en el diagnóstico de la alergia al huevo realizaron dos PEOC abiertas, una con CHC y otra con CHD, en un intervalo inferior a 30 días.

Para la PEOC abierta con CHC se mezclaron con azúcar 43 ml (~43,72 g) de clara cruda, que corresponden a una clara de un huevo pequeño. Para la PEOC abierta con CHD se diluyeron 3600 mg de CHD en 43 ml de zumo de naranja azucarado

Las PEOC con CHD y CHC consistieron en nueve dosis 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6, 9 y 20,2 ml (dosis acumulada de 43 ml), administradas a intervalos de 20 min (Tabla 5).

La PEOC se detenía si:

1. Se producían síntomas objetivos (por ejemplo, habones, estornudos, secreción nasal, tos y/o dificultad respiratoria).
2. Si los síntomas eran subjetivos, de leves a moderados (prurito oral, dolor abdominal), persistiendo durante más de 40 minutos.
3. Si los síntomas eran subjetivos pero graves (dolor abdominal grave) con independencia de su duración.
4. Cuando era tolerada una dosis acumulada de 43 ml.

Tabla 5. Esquema de dosificación de las pruebas de exposición oral con CHC y CHD.

Dosis no.	Clara de huevo cruda	Clara de huevo deshidratada		
	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Peso (mg)	Contenido de proteínas (mg)
1	0,1	0,1	8	7
2	0,2	0,2	17	13
3	0,5	0,5	42	32
4	1	1	84	65
5	2	2	167	131
6	4	4	335	261
7	6	6	502	392
8	9	9	753	588
9	20,2	20,2	1691	1319
Total	43 ml	43 ml	3600 mg*	2808 mg

* 3600 mg de clara deshidratada equivalen a clara de un huevo de tamaño pequeño.

Las PEOC fueron clasificadas de esta forma como positivas, si el paciente cumplía cualquiera de los tres primeros supuestos: síntomas objetivos (por ejemplo, habones, estornudos, secreción nasal, tos y/o dificultad respiratoria), síntomas subjetivos de leves a moderados (prurito oral, dolor abdominal) que persistieran durante más de 40 minutos o síntomas subjetivos graves (dolor abdominal grave) con independencia de su duración, o negativas, si cumplía el cuarto supuesto: tolerar una dosis acumulada de 43 ml. Los pacientes permanecían en observación durante 2 horas tras la administración de la última dosis en el caso de un resultado negativo o 2 horas después de que los síntomas se resolvieran en el caso de un resultado positivo.

En las PEOC positivas fueron registradas la dosis puntual y la dosis acumulada que desencadenó la reacción alérgica. Además, se registró el tipo de síntomas que se producían

para conocer si existía correlación entre ambas fuentes de huevo con relación a la gravedad de la reacción.

4.7.2.2. Prueba de exposición oral doble ciego con CHD controlada con placebo

Las pruebas de exposición activo y placebo de la PODCCP del ensayo clínico se realizaron en días diferentes con un intervalo inferior a 1 mes (Bindsvlev-Jensen y cols., 2004) (Anexos V y VI). La fuente alergénica utilizada para la prueba de exposición activa fue CHD que fue mezclada con 43 ml de zumo de naranja azucarado. La prueba con placebo se realizó utilizando solamente zumo de naranja azucarado.

En cada uno de los 2 días de PODCCP, se administraban hasta nueve dosis. La dosificación de la prueba de exposición con activo consistió en la administración de 7, 13, 32, 65, 131, 261, 392, 588 y 1319 mg de proteína de clara de huevo (dosis acumulada 2808 mg) a intervalos de 20 minutos. La prueba con placebo se realizó administrando los mismos volúmenes que para cada dosis de activo (iguales que los volúmenes que habían sido utilizados para las PEC con CHC y CHD), con el mismo intervalo y hasta una dosis acumulada de 43 ml.

Los sujetos superaban la prueba, resultado negativo, cuando consumían con éxito la dosis máxima de activo (CHD) o placebo. La prueba se consideró positiva si se desarrollaban síntomas como los descritos para las PEOC con CHC y CHD. Fueron registradas las dosis puntual y acumulada de CHD que produjeron síntomas en T0 y entre los pacientes del GI y del GC en los que la PODCCP en T2 resultó positiva. El objetivo fue analizar el cambio en la dosis umbral puntual comparando las dosis que provocaron síntomas en T0 y T2. Se realizó el mismo registro entre los pacientes del GI2 que tuvieron una PODCCP positiva en T3.

El seguimiento durante las PODCCP fue realizado bajo los mismos criterios que para las PEOC con CHC y CHD del apartado 4.7.2.1.

4.7.3. Inmunoterapia oral con huevo

El protocolo de inmunoterapia oral con huevo consistió en 3 fases: fase de inducción o incremento de dosis rápido (FIR), Fase de inducción lenta (FIL) y fase de mantenimiento (FM).

La fuente alergénica utilizada en las FIR y FIL de la ITOH fue CHD. La dosis objetivo en la fase de inducción o de incremento de dosis fue de 3.600 mg de CHD, dosis equivalente a una clara de huevo cruda. El protocolo de ITOH, que siguió el procedimiento descrito por Staden y cols. (Staden y cols., 2007) con algunas modificaciones (Tabla 6) (Anexo VII), constaba de tres fases:

i. La FIR, que consistió en la administración en un día de 0,08, 0,2, 0,3, 0,5, 1, 2, 5, 9, 17, 35, 70 y 140 mg de proteína de clara de huevo (dosis acumulada 280 mg) en intervalos de 20 minutos.

ii. La FIL, se diseñó con aumentos semanales en la dosis de: 0,02, 0,3, 3, 14, 68, 188, 352, 1404 mg y 2808 mg de proteína de clara de huevo.

iii. La FM, que consistía en tomar al menos un huevo poco cocinado (por ejemplo, huevo frito, tortilla poco cocinada o revuelto) de manera obligatoria cada 48 horas. Además, durante esta fase, el sujeto podría tomar libremente cualquier otro alimento que contuviese huevo crudo (ej. pasteles, tartas, salsas y helados), cocido o calentado.

El tiempo transcurrido entre la PODCCP basal y la FIR fue de menos de 2 semanas. Tanto la FIR como los incrementos de dosis de la FIL se llevaron a cabo en el Hospital de Día de Alergología. El final de la FIR se determinó por el inicio de una reacción alérgica con cualquiera de las 12 dosis o después de la administración de la última dosis (140 mg). Cada paciente se mantuvo bajo vigilancia durante las dos horas siguientes a la administración de la última dosis. No era preciso que el paciente tolerase una cantidad mínima de clara de huevo en la FIR para poder pasar a la FIL.

Tabla 6. Protocolo de ITOH. FIR y FIL.

Nº Dosis	Dosis de CHD (mg)	Dosis acumulada de CHD (mg)	Dosis de proteínas (mg)	Dosis acumulada de proteínas (mg)
FIR				
1	0,1	0,1	0,08	0,08
2	0,3	0,4	0,2	0,3
3	0,4	0,8	0,3	0,6
4	0,6	1,4	0,5	1,1
5	1,3	2,7	1	2
6	2,6	5,3	2	4
7	6,4	11,7	5	9
8	11,5	23,2	9	18
9	21,8	45	17	35
10	44,9	89,9	35	70
11	89,7	179,6	70	140
12	179,5	359,1	140	280
FIL				
1	0,03		0,02	
2	0,4		0,3	
3	3,8		3	
4	17,9		14	
5	87,2		68	
6	241		188	
7	451,3		352	
8	1800		1404	
9	3600		2808	

Protocolo modificado de Staden y cols. (Staden y cols., 2007). La FIR consistió en la administración en un día de hasta 12 dosis de proteína de clara de huevo (dosis acumulada 280 mg) en intervalos de 20 minutos. La FIL consistió en aumentos en la dosis de proteína de clara de huevo realizados una vez por semana. La FIL comenzaba con la dosis de CHD más alta tolerada en la FIR. Tanto la FIR como los incrementos de dosis de la FIL se llevaron a cabo en el Hospital de Día. **CHC**, clara de huevo cruda; **CHD**, clara de huevo deshidratada; **FIL**, fase de incremento de dosis lenta; **FIR**, fase de incremento de dosis rápida.

La FIL comenzaba con la dosis de CHD más alta tolerada en la FIR. Los aumentos de dosis se realizaron una vez a la semana en el Hospital de Día. Si el paciente toleraba la dosis, continuaba con la ingestión diaria domiciliaria de esa misma dosis hasta la semana

siguiente. En el caso de que se produjera una reacción adversa al aumentar la dosis durante la FIL, la dosis tolerada previamente se prescribía diariamente durante la semana siguiente y se realizaba un nuevo intento de aumento de dosis una semana después.

Para los pacientes del GI2 se decidió seguir un protocolo de FI modificado en el que la FIL se iniciaba un día después de la PODCCP por la última dosis de huevo tolerada en la prueba de exposición, prescindiendo de esta manera de la FIR.

La FM se iniciaba solamente si se cumplían dos condiciones: Tolerar 2808 mg de CHD el último día de la FIL y tolerar veinticuatro horas después una clara de huevo cruda administrada en una sola dosis de forma abierta.

En el caso de que se produjera una RA en el domicilio durante la FI o durante la FM, el sujeto era evaluado al día siguiente en el Hospital de Día y seguía un plan personalizado de acuerdo con la gravedad del evento. Los pacientes que no alcanzaban la dosis máxima de 2808 mg de proteína o 3.600 mg de CHD durante la FIL, por haber presentado RAs o por falta de adherencia, fueron considerados como fracasos del tratamiento.

4.7.4. Seguimiento durante la ITOH: Clasificación de las reacciones adversas

Los padres recibieron recomendaciones sobre cómo debían preparar el alimento en el domicilio, que la toma de este debía realizarse por la tarde y que se evitaran en las 2 horas previas y siguientes, el ejercicio físico intenso y la toma de antiinflamatorios no esteroideos (Anexo VIII).

Las RAs fueron clasificadas según la gravedad como leves (síntomas orofaríngeos [SOF], cutáneos, digestivos autolimitados o rinitis), moderadas (RAs leves más dificultad respiratoria leve) y graves (dificultad respiratoria grave y/o síntomas de hipotensión arterial) (Clark y cols., 2004) (Anexo IX). Los padres fueron entrenados para reconocer y tratar las RAs que pudieran producirse.

El protocolo seguido para tratar las RAs producidas por la administración de una dosis de CHD fue:

- SOF y/o dolor abdominal:
 - Observación. Si la resolución era espontánea la pauta de ITOH continuaba.
 - En caso de dolor abdominal intenso y persistente (>40 min), se administraba dexclorfeniramina jarabe (1,25 mL para niños de 2-6 años; 2,5 mL para 6-12 años; 5 mL para >12 años) y se repetía la misma dosis de CHD a las 24 horas.
- Vómitos y/o diarrea, recurrentes:
 - Observación hasta su control.
 - A las 24 horas se repetía la misma dosis de CHD. Si la reacción se repetía, se administraba en el Hospital de Día la dosis anterior de CHD según la pauta de ITOH. Si era tolerada se seguía la pauta.
- Habones peribucales o faciales:
 - Observación. Si la resolución era espontánea continuaba la pauta.
- Urticaria generalizada y/o angioedema y/o rinoconjuntivitis:
 - Administración de dexclorfeniramina jarabe (1,25 mL para niños de 2-6 años; 2,5 mL para 6-12 años; 5 mL para >12 años). Prednisona 1 mg/kg según criterio del facultativo.
 - Al día siguiente, administración en el Hospital de Día de la dosis anterior de CHD según la pauta. Si era tolerada la pauta continuaba.
- Disfonía y/o disfagia y/o disnea y/o sibilancias y/o disminución del nivel de conciencia:
 - Por este orden, administración de adrenalina vía intramuscular (0,01 mg/kg), dexclorfeniramina jarabe (1,25 mL para niños de 2-6 años, 2,5 mL para 6-12 años, 5 mL para >12 años) y prednisona 1 mg/kg. Si era necesario, se completaba con otras medidas como oxigenoterapia, salbutamol inhalado, hidrocortisona vía intravenosa (100-200 mg) o repetición de una nueva dosis de adrenalina a los 5-15 minutos.
 - Se valoraba suspender la ITOH o administrar al día siguiente en el Hospital de Día la 2ª dosis anterior tolerada de CHD de la pauta.

Durante la FI el paciente recibía premedicación con cetirizina 10 mg/24 horas con el objeto de minimizar síntomas leves (ej. SOF, dolor abdominal) que pudiesen producirse. El pretratamiento era administrado desde el inicio de la FI hasta la mitad de la primera semana de mantenimiento, posteriormente era suspendido.

La ITO era suspendida, y se consideraba que había fracasado, si se producía:

- 1 reacción grave sin cofactor identificado.
- >2 reacciones moderadas.
- Abandono del tratamiento por parte del paciente, o de los padres o tutores.
- Baja adhesión al tratamiento.

El cumplimiento de la ITOH y el registro de las RAs domiciliarias fueron llevados a cabo por los padres mediante hojas de registro durante todo el tratamiento (Anexo X).

4.7.5. Exploración de la TP e intervenciones posteriores

Los pacientes del GI que alcanzaban la FM en los primeros 3 meses desde el inicio de la ITOH seguían tras este tiempo una dieta de evitación de huevo durante 1 mes. Después eran sometidos a una PODCCP para confirmar si habían obtenido el estado de TP. Aquellos pacientes del GI que alcanzaban la FM tras más de 3 meses desde el inicio de la ITOH no seguían posteriormente dieta de evitación de huevo, considerándose que habían obtenido el estado de desensibilización, pero no el de TP.

A los 4 meses del inicio del estudio se sometió tanto a los pacientes del GI como del GC a una PODCCP según el protocolo descrito.

Los participantes del GI que superaron la PODCCP recibieron instrucciones para que reintrodujesen el huevo en su dieta a voluntad (*ad libitum*). Los pacientes podían tomar libremente huevo cocinado y cualquier alimento que contuviese huevo crudo, cocido y/o calentado, aunque se les recomendaba que tomaran huevo regularmente. Los pacientes del

GC con una PODCCP negativa salieron del estudio indicándoles que podían incorporar el huevo en su dieta. Los participantes del GI y del GC que no superaron la PODCCP fueron incluidos en el GI2 (Figura 3).

A los pacientes del GI2 se les sometió a ITOH con un protocolo modificado en el que la FIL se inició con la última dosis tolerada en la PODCCP un día después de realizar esta prueba. Tras finalizar la FIL continuaron tomando huevo durante la FM siguiendo la pauta descrita anteriormente. A los 19 meses se volvió a explorar si el paciente había alcanzado el estado de TP siguiendo la misma metodología descrita previamente. Los participantes que superaban esta prueba recibían instrucciones para incluir el huevo en su dieta *ad libitum*.

Los pacientes que no superaban la PODCCP a los 19 meses fueron desensibilizados de nuevo siguiendo el protocolo de FI modificado.

4.7.6. Seguimiento a largo plazo

A partir de los 19 meses de tratamiento los pacientes eran evaluados una vez al año. Cada visita de revisión se completaba con un cuestionario sobre los hábitos de ingestión de huevo, que incluían la cantidad, presentación y frecuencia de consumo del alimento, la aparición de RAs durante ese año, la relación de estas con la presencia de cofactores y el tratamiento administrado durante las mismas. Durante este periodo, los pacientes recibían en cada revisión una prescripción de adrenalina autoinyectable que les permitiera tratar una eventual reacción grave.

En cada evaluación se realizaba una extracción de sangre para determinar los niveles de sIgE-C, sIgE-OVA, sIgE-OVM y sIgG4-C. La decisión de explorar la TP se tomaba en base a la evolución de los niveles sIgE-C y sIgE-OVM a lo largo de ese periodo. Cuando los niveles de sIgE-C e sIgE-OVM se encontraban por debajo de los puntos de corte establecidos previamente en el estudio, se le indicaba al paciente que retirara el huevo de la dieta durante 4 semanas. Transcurrido ese tiempo, el paciente era sometido a una PEOC con CHD siguiendo el protocolo descrito. Si la prueba era negativa se consideraba que el paciente había alcanzado la TP.

Se elaboró un registro de los pacientes del GI2 que no habían alcanzado la TP en los 19 primeros meses de ITOH y en los que se había explorado la obtención de este estado a lo largo de los 5 años siguientes. Fueron analizados los datos relativos a TP entre los 18 meses y los 7 años de ITOH y la evolución de los marcadores inmunológicos.

Durante el diseño del estudio no se contempló realizar un cuestionario de calidad de vida relacionado con la salud. Sin embargo, a los 7 años de seguimiento sí se realizó un cuestionario telefónico a las familias de los pacientes que habían completado con éxito el tratamiento de ITOH.

Las 21 preguntas realizadas en dicho cuestionario quedan recogidas en el Anexo XI. El cuestionario incluyó 10 preguntas sobre satisfacción relacionada con el tratamiento de ITOH. De manera breve, las preguntas realizadas tuvieron como objetivo recopilar la siguiente información:

- Hábitos de consumo de huevo.
- RAs relacionadas con la ingestión de huevo.
- Grado de satisfacción de la introducción del huevo en la dieta.

4.8. Procedimientos *in vitro*

4.8.1. Determinaciones de IgE e IgG4 sérica a huevo y sus fracciones proteicas

Se realizaron determinaciones de IgE total, IgE específica para alérgenos nativos de clara de huevo, OVM (Gal d 1) y OVA (Gal d 2), e IgG4 específica para clara de huevo mediante fluoroenzimoinmunoanálisis (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid, España). Se siguieron las indicaciones del fabricante en todas las muestras de suero con EDTA de los pacientes activo y control para evaluar la sensibilización alérgica. El resultado se expresó en UI/mL para la IgE total y kU/L para la IgE específica.

4.8.2 Electroforesis de la CHD y la CHC en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE)

El SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo con Laemmli (Laemmli y cols., 1970) usando el sistema de electroforesis Hoofer SE 600 (GE Healthcare, Little, Chaffont, Buckinghamshire, Reino Unido). Las concentraciones de poliacrilamida al 14% (p/v) y 5% (p/v) se usaron para geles separados y apilables, respectivamente. Las muestras de CHD y CHC se mezclaron con Tris 0,1 M (pH 6,8) que contenía SDS al 4% (p/v), glicerol al 20% (p/v), 2 b-mercaptoetanol al 10% (p/v) y 0,02% (p/v) azul de bromofenol; Se cargaron 20 µg de proteína en cada carril. La electroforesis se llevó a cabo en Tris-HCl 0,025 M (p/v) (pH 8,3), glicina 0,192 M (p/v) y SDS al 0,1% (p/v). Los geles se tiñeron con la solución de tinción de proteínas PageBlue (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá) para garantizar una separación y visualización de proteínas adecuada o usado para la inmunotransferencia, tal como se describe a continuación.

4.8.3 Inmunotransferencia IgE

Las bandas y puntos de proteína de CHD y CHC separados por SDS-PAGE se transfirieron mediante transferencia semiseca sobre láminas de nitrocelulosa de acuerdo con el método de Towbin y cols. (Towbin y cols., 1979). Las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 al 0,1% (PBS-T), leche desnatada en polvo al 3% y albúmina de suero bovino al 3% durante 2 horas temperatura ambiente y se incubaron durante la noche a 4°C con suero diluido al 1/10 en solución salina tamponada con Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 al 0,05%. Después de cinco lavados con PBS-T, las transferencias se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo IgE antihumano de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Nordic Immunological Laboratories, Cultec SL, Madrid, España) diluido al 1/5000 en PBS con 0,05 % Tween-20 y 1,5% de leche desnatada en polvo. Finalmente, después de cinco lavados con PBS-T, las bandas de proteína se visualizaron usando quimioluminiscencia mejorada (GE Healthcare, Little, Chaffont, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La IgE inmunodetección se llevó a cabo con

un grupo de sueros obtenido de los pacientes con resultados positivos en las PEOC con CHD y CHC.

4.8.4. Inhibición de la inmunotransferencia IgE

Se realizó con CHD y CHC en fase sólida y como inhibidores en la fase líquida y el conjunto de sueros obtenidos de aquellos pacientes con resultados positivos en las PEOC con CHD y CHC.

4.8.5. Análisis de citoquinas Th1 y Th2 en suero de pacientes durante la ITOH

Las determinaciones se realizaron mediante ELISA con un sistema multiplex de cuantificación simultánea de citoquinas Th1 / Th2. Para ello se utilizó el kit Milliplex Catalog. ID.HSCYTMAG-60SK-13.Sens. Human Cytokine MAGNETIC (Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU.). La concentración de citoquinas fue expresada en pg/ml.

Se analizaron 13 citoquinas: GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70) e IL-13 y la relación de citoquinas Th2/Th1: (IL-4+IL-5+IL-6+IL-10+IL-13)/(IFN- γ +IL-2+TNF- α).

Para el análisis de citoquinas fueron seleccionados sueros de 7 sujetos del GI que completaron con éxito el tratamiento de ITOH y no presentaron durante el periodo de ITOH otras enfermedades alérgicas activas como dermatitis atópica, alergia a otros alimentos distintos al huevo, asma y/o rinitis. El objetivo fue que ninguna otra patología alérgica interfiriese en la evolución de los niveles de citoquinas.

Las determinaciones se realizaron antes de la ITOH (T0) y a los 3 (T1), 12 y 18 meses del inicio del tratamiento.

Posteriormente, se decidió realizar un segundo análisis en el que fue revisado el ensayo para aumentar la sensibilidad y especificidad de las determinaciones. Se decidió

centrar el análisis en las citoquinas que se interpretó que podrían tener mayor implicación en las respuestas Th1 y Th2. Fueron estudiados los niveles séricos de las siguientes citoquinas:

- Th1: IFN- γ .
- Th2: IL-4, IL-5, IL-13.
- Treg: IL-10.
- Relación de citoquinas Th2/Th1: IL-4+IL-5+IL-10+IL-13/IFN- γ .

Los estudios de SDS-PAGE, inmunotransferencia de IgE, inhibición de la inmunotransferencia de IgE y análisis de las citoquinas Th1 y Th2, fueron realizados en los Laboratorios del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España).

4.9. Tamaño de la muestra del ensayo clínico de ITOH

El tamaño de muestra necesario fue predeterminado para estimar las proporciones de pacientes con TP después de la ITOH y sin ella; una α del 95% y una potencia estadística ($1-\beta$) del 90%; una proporción esperada del 36% en el GI, basada en el estudio de Staden y cols. (Staden y cols., 2007) y del 2% en el GC. Suponiendo una tasa de 15% de sujetos perdidos durante el seguimiento en cada grupo, el número mínimo de sujetos en cada grupo para realizar estas estimaciones fue de 30.

4.10. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre los datos basales y a los 4 meses de los GI y GC, las diferencias intragrupo en el GI y el GC entre al inicio y los 4 meses, y los marcadores inmunológicos, fue utilizada la prueba t de Student para variables cuantitativas y la prueba de chi-cuadrado se aplicó para variables cualitativas.

La prueba exacta de Fisher se realizó para determinar si las proporciones de pacientes que alcanzaban la TP eran diferentes entre el GI y el GC.

Todos los resultados clínicos se evaluaron mediante análisis por intención de tratar.

Para evaluar la variación de la dosis umbral o dosis que produjo una reacción alérgica entre el tiempo basal y a los 4 meses de los pacientes del GI que no pasaron la PODCCP a los 4 meses, se realizó la prueba de rango de Wilcoxon. La prueba U de Mann-Whitney se realizó para evaluar las diferencias entre la dosis umbral de los pacientes del GI y del GC que no pasaron la PODCCP a los 4 meses.

Los predictores individuales potenciales para desarrollar TP considerados en el análisis fueron: la edad basal, el sexo, los antecedentes de asma, los antecedentes de anafilaxia previa a la ingestión de huevos, la frecuencia y gravedad de las RAs durante la ITOH, la dosis desencadenante de síntomas en la PODCCP al inicio del estudio y las sIgE-C, sIgE-OVM e sIgE-OVA a los 3 meses de iniciarse la ITOH.

El análisis de la curva ROC estudió el rendimiento diagnóstico de la sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM a los 3 meses para predecir el resultado la PODCCP a los 4 meses. La especificidad, el índice de Youden (YI) y la razón de verosimilitud (LR) se usaron para determinar el punto de corte más apropiado. Después de identificar el punto de corte, se calcularon los valores predictivos positivos y negativos para determinar la probabilidad de pasar o fallar la PODCCP a los 4 meses, por encima o por debajo de dicho corte, respectivamente.

Para el análisis de citoquinas Th1 y Th2 en suero se determinó la media, mediana, desviación típica, valores mínimo y máximo y percentiles 25, 50 y 75 de los resultados obtenidos en cada tiempo de tratamiento. Se realizó un análisis estadístico para determinar si existían diferencias en los niveles de citoquinas en los diferentes tiempos del tratamiento. Para ello se utilizó la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon.

5

Resultados

5.1. Estudio de la alergenicidad de la clara de huevo deshidratada

5.1.1. Participantes

El 76,9% (40/52) de los pacientes que fueron invitados a participar en el estudio accedieron, cumpliendo los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. La edad de los pacientes varió de los 2 a 17 años (media 6,77 años, desviación estándar [DE] 3,96); El 67,5% de los pacientes fueron varones. La duración media de la alergia al huevo fue de 5,43 años (DE 0,97). El inicio de la alergia al huevo se produjo en todos los casos con síntomas inmediatos. Los síntomas que presentaron fueron (en algunos casos más de uno de los descritos a continuación): 52,5% urticaria orofacial, 32,5% síntomas gastrointestinales, 32,5% urticaria generalizada, 10% rinitis y 5% asma (Tabla 7). El 87,5% de los pacientes tenían antecedentes personales de dermatitis atópica, 35% de rinitis, 40% de asma y 45% de otras alergias alimentarias.

5.1.2. Pruebas cutáneas

Los resultados de las PC a clara de huevo, OVA, OVM, CHD y CHC se muestran en las Tabla 7. La prueba cutánea con CHD y el prick-prick con la CHC resultaron positivos en todos los pacientes que tuvieron una PEOC positiva. El tamaño de la PC no mostró diferencias significativas entre los extractos de CHC y CHD en los pacientes con PEOC negativa (media 4,81 y 4,37 mm, respectivamente, $P > 0,05$), ni en los pacientes con PEOC positiva (media 8,4 y 7,1 mm, respectivamente, $P > 0,05$).

5.1.3. Determinaciones de IgE

El resultado de las determinaciones de sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM en suero se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Características clínicas e inmunológicas basales, y resultado de las PEOC con CHC y CHD de los pacientes incluidos en el estudio de alergenidad de la CHD.

No.	Edad (años)	PRA (síntomas)	PC (mm) (extractos comerciales)			PC (mm)		sIgE (kU/L)			PEOC
			C	OVA	OVM	CHC	CHD	C	OVA	OVM	
1	17	UG + GI	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
2	16	UO + GI	5	3	4	8	7,5	1,62	1,75	1,91	NEG
3	15	UG+R + GI	4	5	3	NR	NR	0,5	0,35	0,36	NEG
4	14	UG	6	4	4	4	3	3,15	1,8	2,15	NEG
5	13	GI	5	0	0	NR	NR	0,75	1,04	<0,35	NEG
6	12	UO + GI	5	4	6	NR	NR	0,92	1,1	1,09	NEG
7	10	UG + A	7	5	4	NR	NR	0,53	0,35	0,56	NEG
8	9	UO	5	3	4	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
9	9	UG	4	0	5	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
10	11	UO + GI	4	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
11	8	R	6	0	3	NR	NR	0,69	0,72	0,68	NEG
12	8	UO	5	4	6	5,5	5	0,88	1,11	0,96	NEG
13	6	UO	7	3	4	7,7	7,5	1,08	1,29	0,65	NEG
14	7	UO	5	3	3	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
15	6	UG + A	5	4	3	7,5	7	1,17	1,38	0,91	NEG
16	4	UO	5	3	0	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
17	4	UO	3	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
18	2	UO	3	3	0	3	3	0,48	0,58	0,71	NEG
19	4	UO	3	0	3	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
20	4	UO	3	3	0	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
21	5	UG	3	3	0	3	3	0,35	0,35	0,35	NEG
22	3	UO	4	0	4	4,5	4	<0,35	2,11	<0,35	NEG
23	5	GI	3	0	0	NR	NR	1,07	0,61	0,75	NEG
24	2	UO	3	3	0	3	3	<0,35	<0,35	<0,35	NEG
25	3	UO	4	0	0	NR	NR	<0,35	<0,35	<0,35	NEG
26	5	UG	4	0	0	3	3	0,41	0,45	<0,35	NEG
27	2	UO	3	3	0	3	3	<0,35	<0,35	<0,35	NEG
28	3	UG	0	3	0	NR	NR	NR	NR	NR	NEG
29	3	UO + GI	3	3	4	4,5	4	0,59	0,68	0,4	NEG
30	3	UO	3	3	3	NR	NR	0,45	0,69	0,48	NEG
31	7	UG	5	3	6	6,6	5,5	1,42	1,2	1,76	POS
32	7	UO+GI	6	5	4	9,5	7	398	260	256	POS
33	6	UO+R+GI	6	3	5	7	7	6,53	8,49	2,23	POS
34	6	UG	6	5	6	9,5	8	9,29	12,5	9,84	POS
35	5	GI	7	3	5	9,5	6	15	4,21	8,84	POS
36	5	UG+R	6	4	0	7,5	4,5	0,98	1,38	<0,35	POS
37	6	GI	6	2	5	9,5	9,5	13,7	11,3	2,46	POS
38	5	UG	5	3	4	7	5,5	0,63	0,83	0,4	POS
39	6	UO	5	3	4	7	8	1,1	1,01	0,9	POS
40	5	GI	5	5	5	11	10	5,79	4,77	6,57	POS

No., número de paciente; *PRA*, primera reacción alérgica tras la ingestión de huevo; *UO*, urticaria orofacial; *UG*, urticaria generalizada; *GI*, síntomas gastrointestinales; *R*, rinitis; *A*, asma; *PC*, pruebas cutáneas; *C*, clara de huevo; *CHC*, clara de huevo cruda; *CHD*, clara de huevo deshidratada; *OVA*, ovoalbúmina; *OVM*, ovomucoide; *sIgE*, IgE sérica específica; *NR*, no realizado; *PEOC*, prueba de exposición oral controlada; *NEG*, negativa; *POS*, positiva.

5.1.4. SDS-PAGE

El perfil proteico de los extractos de CHC y CHD fue muy similar. Las principales proteínas se observaron a 14, 37, 45, 55, 66, 77 y 150 kDa (Figura 4, panel A). Las bandas de 14 kDa podrían corresponder a lisozima, 37 kDa a OVM, 45 kDa a OVA, 77 kDa a ovotransferrina y 150 kDa a ovomucina. La banda de 66 kDa podría corresponder a α -livetina y su presencia en los extractos, tanto de CHC como de CHD, podría deberse a que estuviesen contaminados con yema.

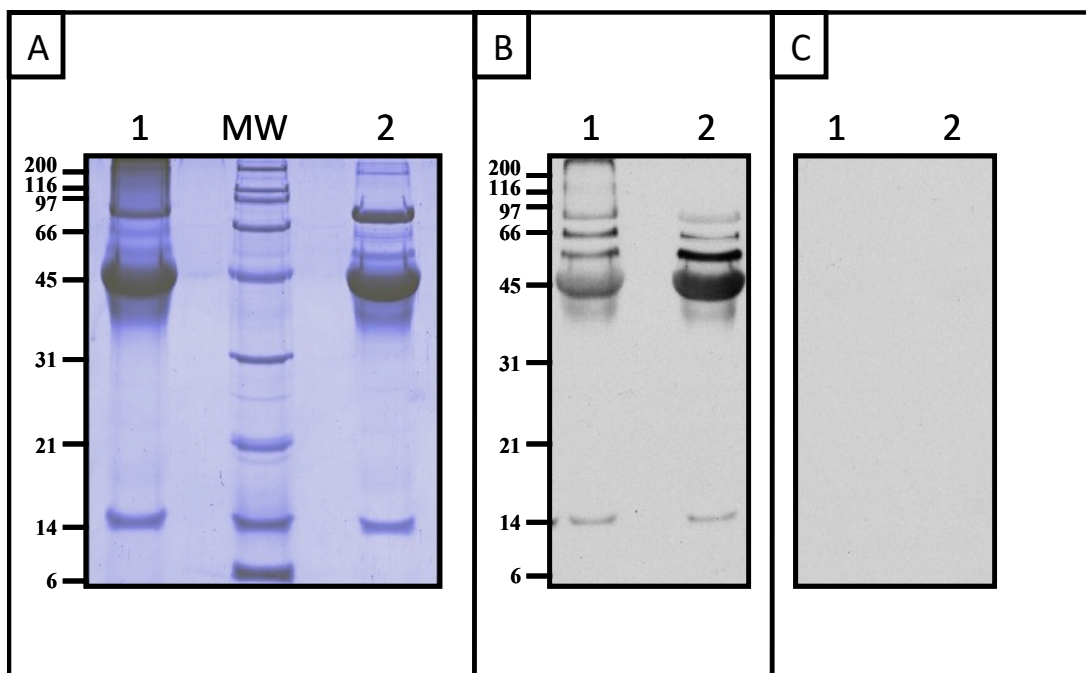


Figura 4. *Panel A*, SDS-PAGE con clara de huevo deshidratada (CHD) (línea 1) y clara de huevo cruda (CHC) (línea 2); *MW*, peso molecular (kDa). *Panel B*, inmunotransferencia de IgE con un pool de sueros de los pacientes que tuvieron las pruebas de exposición oral con CHC (línea 1) y CHD (línea 2) positivas. *Panel C*, inmunotransferencia de IgE control negativo con suero de pacientes no alérgicos con CHC (línea 1) y CHD (línea 2).

5.1.5. Inmunotransferencia de IgE e inhibición del inmunotransferencia de IgE

La inmunotransferencia de IgE mostró que los sueros de los pacientes que tuvieron una PEOC positiva reconocieron las mismas bandas en ambos extractos. Los pesos moleculares de las bandas reconocidas fueron, aproximadamente, 14, 37, 45, 55, 66 y 77 kDa (Figura 4, panel B). Además, la inhibición de inmunotransferencia mostró que la CHD y la CHC eran idénticas alergénicamente, al inhibir por completo un extracto al otro en las diferentes fases. (Figura 5).

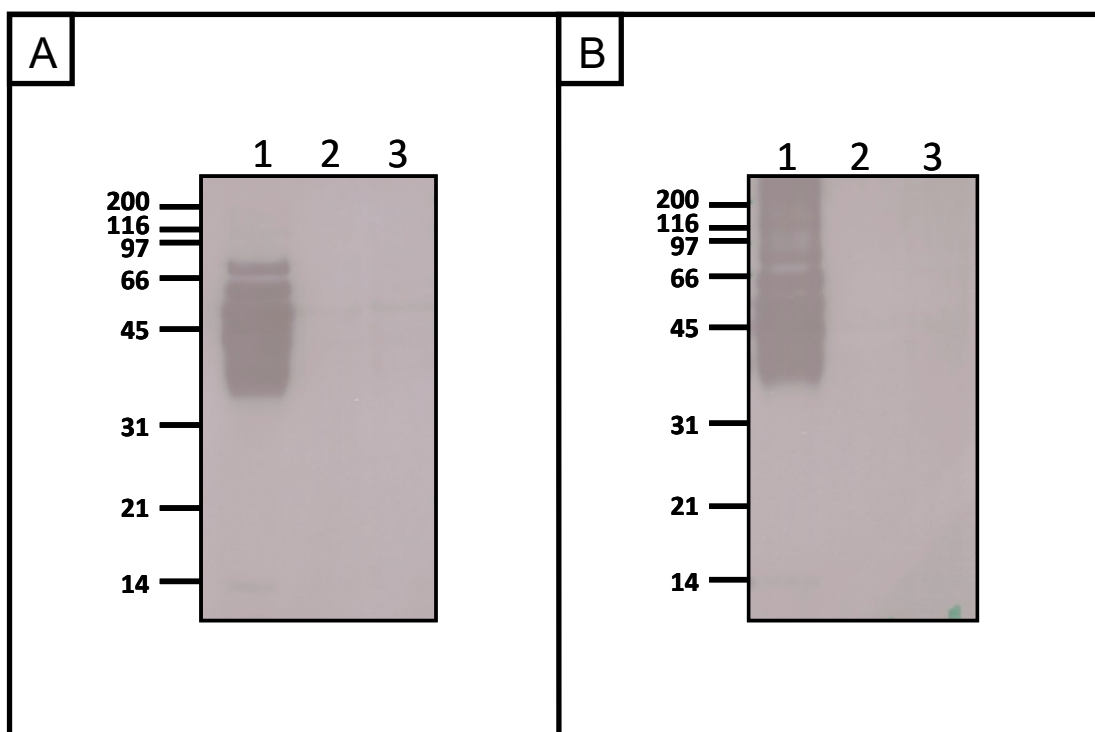


Figura 5. Inhibición del inmunotransferencia de IgE. **Panel A**, fase sólida con clara de huevo cruda; **Panel B**, fase sólida con clara de huevo deshidratada; **Líneas 1**, inmunotransferencia de IgE; **Líneas 2**, inhibición con clara de huevo deshidratada; **Líneas 3**, inhibición con clara de huevo cruda.

5.1.6. Pruebas de exposición oral abierta con CHC y CHD

El tiempo entre las PEOC con CHC y CHD realizadas a cada paciente varió de 1 a 17 días. Diez pacientes (25%) tuvieron un resultado positivo en ambas pruebas, y 30 pacientes (75%) tuvieron un resultado negativo (Tabla 7). En todos los pacientes, la positividad y la negatividad fueron consistentes para ambos tipos de clara de huevo. En el caso de los resultados positivos, no se observaron diferencias significativas entre las dosis puntuales que provocaron síntomas al usar CHD o CHC (media 3 y 2,1 ml, respectivamente, $P > 0.05$) (Tabla 8 y Figura 6). Seis de los 10 pacientes (60%) con resultados positivos presentaron síntomas con la misma dosis de CHD y de CHC; en tres pacientes, las pruebas fueron positivas con una diferencia de una dosis y en un paciente con una diferencia de dos dosis. No se observaron diferencias significativas en la gravedad de las reacciones durante las pruebas positivas con CHD y CHC. Las manifestaciones clínicas en las 10 PEOC positivas con CHD fueron: síntomas cutáneos ($n = 6$), síntomas gastrointestinales ($n = 10$) y rinitis ($n = 2$). Por otro lado, las manifestaciones clínicas en las 10 PEOC positivas con CHC fueron: síntomas cutáneos ($n = 4$), síntomas gastrointestinales ($n = 7$) y rinitis ($n = 3$) (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de las pruebas de exposición oral abierta controlada positivas con CHC y CHD, dosis que desencadenaron síntomas y los síntomas durante las pruebas. Incluye los resultados de las pruebas cutáneas con los dos tipos de clara de huevo.

PEOC						
No.	PC* (mm)		CHC		CHD	
	CHC	CHD	Dosis [†] (ml)/n° dosis	Síntomas	Dosis (ml)/n° dosis	Síntomas
31	6,5	5,5	6/7	UO	9/8	GI
32	9,5	7,0	0,2/2	GI	0,2/2	UO + GI
33	7,0	7,0	2/5	R + GI	6/7	UO + GI
34	9,5	8,0	0,2/2	UO	0,2/2	UO + GI
35	9,5	6,0	2/5	GI	2/5	GI
36	7,5	4,5	1/4	UO	1/4	UO + GI
37	9,5	9,5	6/7	R + GI	9/8	R + GI
38	7,0	5,5	2/5	UO + GI	2/5	UO + GI
39	7,0	8,0	1/4	GI	1/4	UO + GI
40	11,0	10,0	2/5	R + GI	4/6	R + GI

* $P > 0,05$ entre las PC con CHC y CHD.

†Dosis puntual (no acumulada).

No., número de paciente; **CHC**, clara de huevo cruda; **CHD**, clara de huevo deshidratada; **PC**, prueba cutánea; **PEOC**, prueba de exposición oral abierta controlada; **UO**, urticaria orofacial; **GI**, síntomas gastrointestinales; **R**, rinitis.

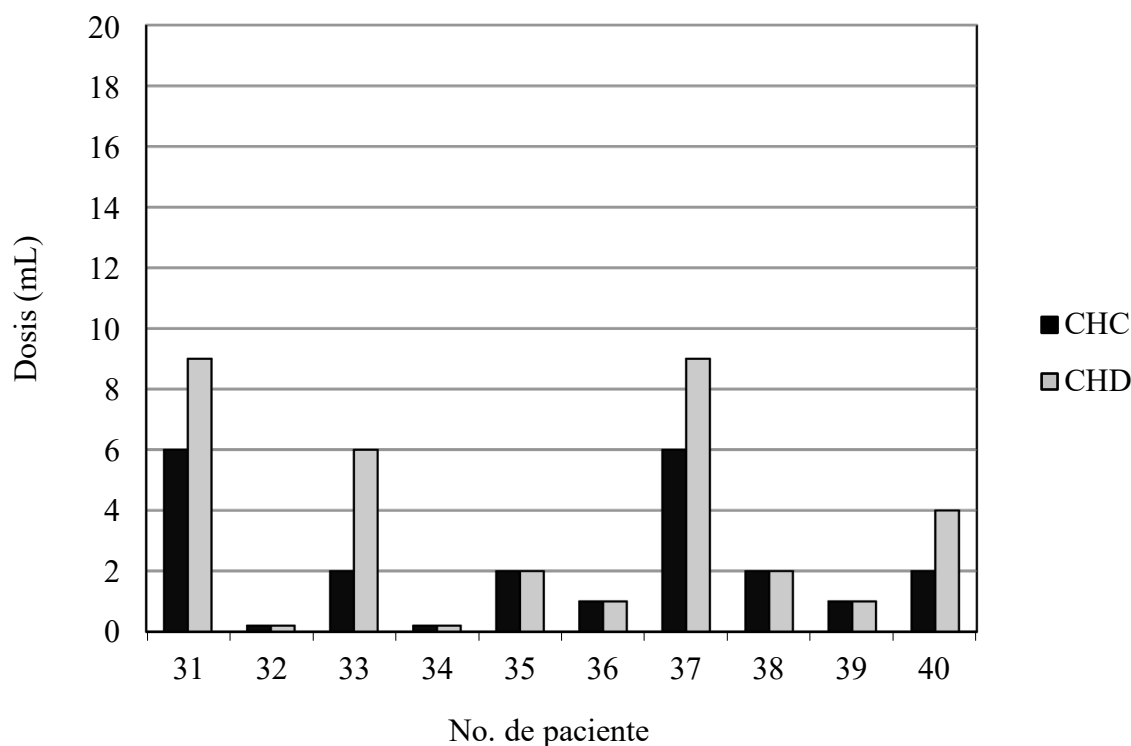


Figura 6. Pacientes con pruebas de exposición oral abierta controlada positivas: dosis que desencadenaron síntomas. $P > 0,05$ entre las dosis que produjeron síntomas con CHC y CHD.

5.2. Eficacia y seguridad del tratamiento de ITOH

5.2.1. Participantes

La Tabla 9 detalla las características clínicas e inmunológicas de la alergia al huevo y la respuesta a la ITOH de cada uno de los participantes en el ensayo clínico.

Tabla 9. Características clínicas e inmunológicas de la alergia al huevo y la respuesta a la ITOH por cada paciente del ensayo clínico.

N	Edad (años) sexo	Dx	Asma	Anaf	PODCCP basal		Pruebas cutáneas (mm)			IgE (kU/L)			IgG4 *	ITOH				
					(mg)													
					DU	DA	Cl	ova	ovm	Cl	ova	ovm	Cl		FI		FM	F
														T	RA	T	RA	
1A	5 (M)	12	No	No	810	1422	8	6	6	1,26	1,7	1,55	0,31	22	1 (UL)	47	0	
2A	7 (M)	12	No	No	360	702	6	4	7	4,15	6,46	2,89	0,72	30	0	60	11 (SOF)	
3A	6 (V)	6	No	No	360	702	5	5	6	2,14	2,96	3,01	1,53	29	0	61	0	
4A	7 (V)	8	No	No	180	342	9	5	10,5	11,5	15,5	7,75	1,99	43	0	47	0	
5A	8 (V)	14	Si	No	9	9	8	7,5	7	5,23	6,75	1,25	0,12	34	0	56	0	
6A	9 (V)	8	No	No	18	27	8,5	6,5	5,5	9,76	12,7	8,64	0,94	55	1 (R+D)	35	0	
7A	8 (V)	36	No	No	45	72	9,5	6	0	7,73	9,49	0,38	0,54	34	0	56	0	
8A	6 (M)	60	Si	Si	45	72	3	3	0	1,44	0,96	0,35	0,5	28	0	62	0	
9A	6 (V)	12	No	No	45	72	7	4	7	1	1,43	1,61	0,03	39	3 (D)	51	1 (R) 2 (D)	
10A	6 (V)	24	Si	Si	45	72	6	6,5	8,5	1,91	2,46	1,91	0,06	28	0	32	0	
11A	7 (V)	9	Si	No	180	342	4,5	5	3	53,7	67,4	51,4	6,21	30	4 (D)	60	2 (D)	
12A	6 (V)	13	No	No	9	9	8,5	5	8,5	85,3	69,6	45	1,81	102	1 (R+D) 8 (D)	ND	ND	
13A	5 (M)	24	No	No	9	9	6	4	5,5	2,88	1,39	3,68	0,33	29	1 (UL)	61	1 (R) 2 (D)	

N	Edad (años) sexo	Dx	Asma	Anaf	PODCCP		Pruebas cutáneas			IgE			IgG4 *	ITOH					
					basal (mg)		CI	ova	ovm	CI	ova	ovm		CI	ova	ovm	FI	FM	F
14A	7 (V)	12	Sí	No	9	9	7,5	6	7	25,3	15,1	23,9	0,46	42	2 (D) (UL)	6	48	6 (UL)	
15A	8 (V)	13	Sí	No	18	27	6	7,5	9	11,3	9,62	15,5	0,36	30	ND		60	0	
16A	5 (V)	9	No	Sí	180	342	11	9	9,5	18,2	10,3	23,1	1,24	39	1 (UL+AL)		51	1 (UG)	
17A	8 (V)	12	Sí	Sí	9	9	5	6,5	5,5	245	185	162	1,26	27	3 (UL+D) 7 (D)	ND	ND	ND	F
18A	9 (V)	ND	No	No	180	342	5	5,5	6,5	1,21	1,18	0,94	0,23	29	0		61	0	
19A	5 (V)	48	ND	ND	45	72	5	4	3	2,57	1,54	<0,35	0,37	29	0		61	12 (D)	
20A	6 (V)	15	Sí	Sí	9	9	6,5	4	8,5	28,3	8,4	15,7	1,62	134	2 (R+D) 8 (D) 1 (R)	ND	ND		
21A	11 (M)	9	No	No	45	72	5	0	4	1,77	0,35	<0,35	0,25	36	0		54	5 (SOF)	
22A	11 (V)	19	Sí	No	90	162	6	6,5	5	5,59	3,45	2,36	3,15	27	5 (D)		ND	ND	F
23A	13 (V)	21	Sí	Sí	180	342	7,5	7	5	13,2	6,19	3,17	0,34	38	1 (R+D)		52	0	
24A	7 (M)	10	No	No	360	702	6	3	4	7,19	8,21	0,5	0,08	29	1 (UL+D)		61	0	
25A	10 (V)	48	No	No	90	162	6	6,5	5	1,61	1,08	0,49	0,05	27	0		63	0	
26A	17 (V)	10	No	Sí	45	72	6	0	5	2,2	0,66	3,3	0,41	46	0		44	0	

N	Edad (años) sexo	Dx	Asma	Anaf	PODCCP basal (mg)		Pruebas cutáneas (mm)			IgE (kU/L)			IgG ₄ *	ITOH			
					DU	DA	Cl	ova	ovm	Cl	ova	ovm	Cl		FI	FM	F
														T	RA	T	RA
27A	7 (V)	9	Sí	No	9	9	10	5	4	11,9	5,47	14,6	0,07	56	2 (SOF) 2 (D) 1 (R)	36	0
28A	5 (V)	10	No	No	180	342	5	4	0	1,04	1,34	<0.35	1,4	29	0	61	0
29A	4(M)	48	No	No	45	72	6	4	6	57,8	30,6	79,8	0,53	31	1 (D) 1 (UG+D) 3 (D)	59	(1 (D)
30A	8 (V)	12	Sí	No	45	72	8	4	5	164	116	76,5	0,45	127	13 (D)	ND	ND
1C	8 (M)	24			180	342	6	3	5,5	2,84	1,42	3,45	0,07				
2C	5 (M)	12			90	162	6	4	5	10,5	14,8	15,7	0,34				
3C	14 (M)	12			9	9	5	4	3	1,29	1,75	0,76	0,07				
4C	8 (M)	9			18	4	3	5	6,5	2,35	2,68	0,76	1,71				
5C	9 (M)	15			90	162	8	5	6	9,48	12,1	5,49	0,07				
6C	11 (M)	9			360	702	3	0	5	0,75	0,73	0,35	0,07				
7C	8 (V)	24			360	702	4	4	4	0,8	0,94	0,35	0,07				
8C	6 (V)	4			9	9	9,5	6	9	6,84	8,91	8,46	0,67				
9C	10 (V)	10			90	162	11	5	11	7,57	10,3	10,6	0,37				

N	Edad (años) sexo	Dx	Asma	Anaf	PODCCP basal (mg)		Pruebas cutáneas (mm)			IgE (kU/L)			IgG ₄ *	ITOH		
					DU	DA	CI	ova	ovm	CI	ova	ovm	CI	FI	FM	F
														T	RA	T
															RA	
10C	8 (M)	10			180	342	5,5	5,5	5,5	2,03	2,42	2,25	0,38			
11C	6 (V)	12			180	342	4	3	2	0,49	0,71	0,6	0,11			
12C	5 (M)	54			1800	3600	3	2	0	NR	NR	NR	NR			
13C	5 (M)	60			180	342	6	5	2	1,79	1,96	0,92	0,31			
14C	7 (V)	9			90	162	9	7	8,5	17,7	22	28	3,64			
15C	9 (V)	48			90	162	4	3	7	0,77	0,35	1,03	0,08			
16C	9 (V)	12			1800	3600	5	6	8	1,26	1,69	1,26	0,25			
17C	6 (V)	10			9	9	6	6,5	6	1,94	2,37	2,34	0,21			
18C	9 (M)	9			9	9	5	7	10	15,9	21,9	18,2	0,22			
19C	8 (M)	9			9	9	8	5	6	5,57	7,3	7,27	0,07			
20C	14 (m)	13			9	9	11,5	13	7	50,5	33,8	7,74	1,55			
21C	9 (V)	12			45	72	6	4	4	0,88	0,94	0,62	0,07			
22C	10 (V)	ND			180	342	5	5	6,5	0,56	0,35	0,87	0,07			

N	Edad (años) sexo	Dx	Asma	Anaf	PODCCP basal (mg)		Pruebas cutáneas (mm)			IgE (kU/L)			IgG ₄ *	ITOH			
					DU	DA	Cl	ova	ovm	Cl	ova	ovm	Cl	FI	FM	F	
														T	RA	T	RA
23C	11 (V)	13			90	162	4	4	5	6,96	6,78	2,83	1,72				
24C	4 (V)	9			90	162	6	4	9,5	55,2	18,2	15,1	1,14				
25C	9 (V)	6			540	702	7	5	5	2,51	2,47	1,64	1,33				
26C	7 (V)	24			180	342	5	5,5	6,5	2,7	2,12	3,12	0,81				
27C	11 (V)	12			1800	3600	6	8	9	1,25	0,41	0,47	0,07				
28C	5 (M)	9			45	72	7	3	4	0,76	0,38	1,16	0,25				
29C	9 (V)	12			9	9	5	4	4	73	43,5	89,1	1,18				
30C	8 (M)	18			90	162	6	4	6	0,65	0,48	0,7	0,007				
31C	13 (M)	9			45	72	8	5	5	1,78	1,33	1,9	0,09				

* IgG₄ sérica específica expresada en kU/L.

A, activo; *AL*, síntomas leves de asma; *Anaf*, antecedentes de anafilaxia por huevo; *C*, control; *Cl*, clara de huevo; *D*, síntomas digestivos; *DA*, dosis acumulada (mg); *DU*, dosis umbral (mg); *Dx*, diagnóstico (meses); *F*, fracaso; *FI*, fase de incremento de dosis; *FM*, fase de mantenimiento; *ITOH*, inmunoterapia oral con huevo; *M*, mujer; *N*, número de paciente; *ND*, no disponible; *ova*, ovoalbúmina; *ovm*, ovomucoide; *PODCCP*, provocación oral doble ciego controlada con placebo; *R*, rinitis; *RA*, reacciones adversas (número y tipo); *SOF*, síntomas orofaríngeos; *T*, duración en días de las FI y FM; *UL*, urticaria local; *UG*, urticaria generalizada; *V*, varón.

El 52,1% (61/117) de los pacientes que fueron invitados a participar en el ensayo clínico aceptaron, cumpliendo los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Los pacientes fueron asignados de manera aleatoria a los grupos GI (30 pacientes) y el GC (31 pacientes). El 73% de los pacientes eran varones (73% en GI y 52% en GC). La edad de los pacientes fue de 5 a 17 años (mediana, 8,71 años; RIC, 6 años). El 87% de los pacientes tenía antecedentes personales de dermatitis atópica, el 59% rinitis, el 41% asma y el 63,9% alergia a otros alimentos diferentes al huevo (Tabla 10).

Tabla 10. Características clínicas e inmunológicas basales, y PODCCP con CHD, según el grupo de estudio. Prueba de t de Student y prueba de chi-cuadrado.

Características	GC (N = 31)	GI (N = 30)	P
Edad			
años (media-DE)	8,71 (2,6)	7,80 (2,9)	0,2
Dermatitis atópica			
porcentaje	83,8	90	0,7
Asma			
porcentaje	41,9	40	0,9
Alergia a otros alimentos			
porcentaje	67,7	60	0,6
IgE total			
kU/L (mediana-rango)	370,5 (113,3-882,5)	603 (352,3-1195,3)	0,2
sIgE-Clara de huevo			
kU/L (mediana-rango)	2,2 (0,9-8)	6,4 (1,9-20)	0,02
sIgE-OVA			
kU/L (mediana-rango)	2,2 (0,7-10,8)	6,3 (1,4-13,3)	0,1
sIgE-OVM			
kU/L (mediana-rango)	2,3 (0,8-7,9)	3,1 (0,8-17,6)	0,4
sIgG₄-Clara de huevo			
mg/L (mediana-rango)	0,2 (0,1-0,9)	0,5 (0,2-1,3)	0,2
Prueba cutánea a clara de huevo, diámetro medio			
mm (mediana-rango)	6 (4-7)	6 (5-7,3)	0,2
Edad de la primera reacción alérgica al huevo			
meses (media-DE)	15,7 (13,8)	18,1 (14,8)	0,5
Dosis que desencadenó síntomas durante la PODCCP basal			
mg (media-DE)	280 (519,9)	122 (169,2)	0,1

GC, grupo control; **GI**, grupo de intervención; **DE**, desviación estándar; **OVA**, ovoalbúmina; **OVM**, ovomucoide; **P**, significación estadística; **PODCCP**, prueba de exposición oral doble ciego controlada con placebo; **sIgE**, IgE sérica específica; **sIgG₄**, IgG₄ sérica específica. No hubo diferencias significativas entre el GI y el GC en las características clínicas basales, a excepción de los niveles de sIgE-C que fueron significativamente más elevados en el GI.

El 23% (7/30) del GI tenía un historial de anafilaxia tras ingerir huevo frente a un 21% del GC. La mediana de la sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM (kU/L) fue de 6,4, 6,3 y 3,1 en el GI frente a 2,2, 2,2 y 2,3 en el GC, respectivamente. El 17% (5/30) del GI y el 10% (3/31) de GC tenían una sIgE-C superior a 50 kU/L (rangos: 53,7-245 y 50,5-73 kU/L, respectivamente). No hubo diferencias significativas entre los grupos GI y GC en las características clínicas basales, a excepción de los niveles sIgE-C que fueron

significativamente superiores en el GI. La media de la dosis umbral puntual que desencadenó síntomas en la PODCCP basal fue de 122 mg (DE 169) en el GI frente a 280 mg (DE 519,9) en el GC.

5.2.2. Eficacia clínica: Desensibilización y TP

A continuación, se describen los resultados de eficacia clínica de la ITOH en los grupos de intervención GI y GI2.

5.2.2.1. Grupo de intervención (GI)

El 93,3% (28/30) de los pacientes del GI fueron desensibilizados. El tratamiento fracasó en el 6,7% (2/30) de los sujetos por presentar RAs repetidas no graves durante la ITOH (principalmente dolor abdominal y vómitos) (Figura 7). La media de tiempo de la FI en los pacientes que fueron desensibilizados con éxito fue de 32,5 días (DE 14). El 83,3% (25/30) de los pacientes precisó menos de 3 meses para completar la FI (media 30 días, DE 10,4). En este subgrupo de pacientes la duración media de la FM fue de 60 días (DE 12,8).

El 10% (3/30) del GI necesitó más de 3 meses para ser desensibilizados (media 121 días, DE 16,8) debido a RAs durante la inmunoterapia. Estos pacientes no realizaron dieta de eliminación en T1 ni PODCCP en T2, y fueron incluidos para el análisis estadístico en el grupo de pacientes que no superó la PODCCP en T2. La mediana de los niveles de sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM de estos pacientes fue de 85,3 (rango 28,3-164), 69,9 (rango 8,4-116) y 45 kU/L (rango 15,7- 76,5), respectivamente. Finalmente, la dosis que provocó los síntomas en la PODDCP basal al inicio del estudio para estos 3 participantes fue de 9 mg en dos pacientes y de 45 mg en el otro.

Durante la FI fueron administradas un total de 1300 dosis, incluyendo las administradas a los pacientes en los que el tratamiento fracasó. Durante la FM los pacientes recibieron un total de 792 dosis.

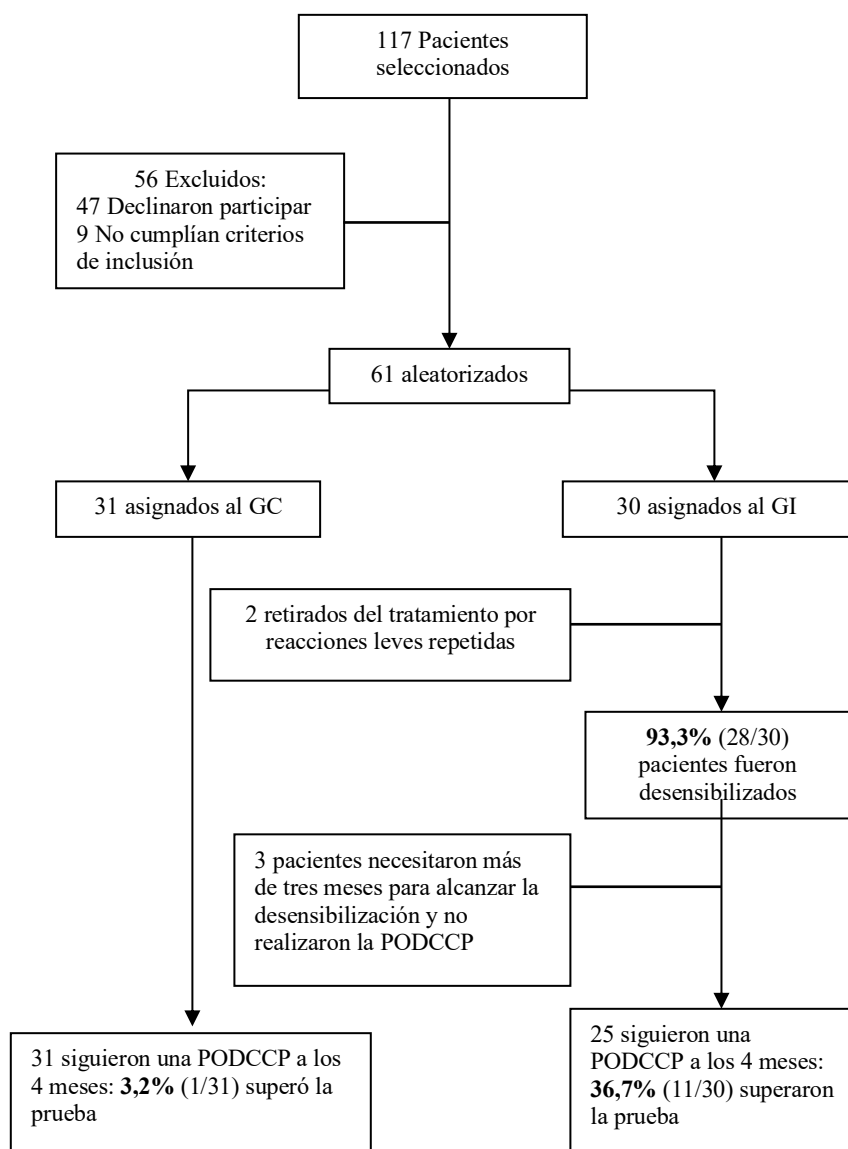


Figura 7. Diagrama de flujo y distribución de los pacientes en los diferentes grupos del estudio. Reclutamiento para el estudio de inmunoterapia oral con huevo, aleatorización y resultados.

GI, grupo de intervención; **GC**, grupo control; **PODCCP**, prueba de exposición oral doble ciego controlada con placebo.

En T2, el 36,7% (11/30) de los pacientes del GI superaron la PODCCP, en comparación con el 3,2% (1/31) de los pacientes del GC que superaron la prueba (IC 95%, 14 a 51%; $P = 0,003$).

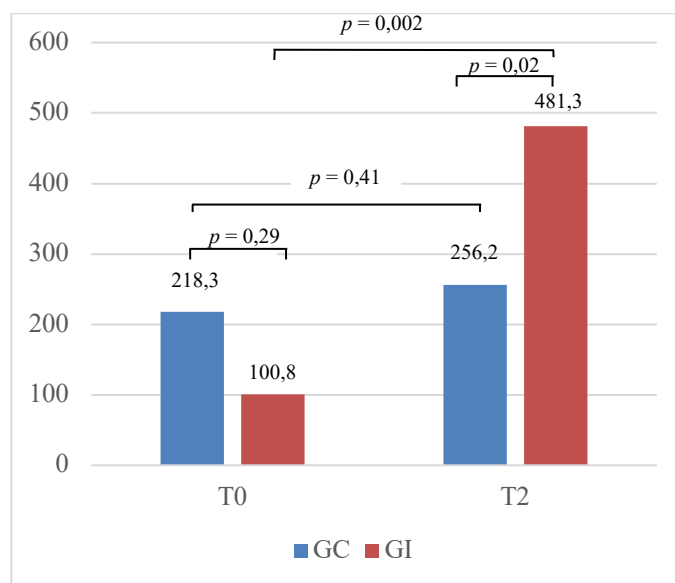
Los resultados indican que el protocolo de ITOH seguido por el GI tuvo una eficacia para desensibilización a 3 meses del 93,3% y para TP a 4 meses del 36,7%, frente al 3,2% de pacientes del GC que alcanzaron espontáneamente la tolerancia a los 4 meses.

A los pacientes del GI que superaron la PODCCP en T2 se les indicó consumir regularmente productos alimentarios que contuviesen huevo crudo, cocido o calentado y al menos 2 huevos poco cocinados por semana durante el seguimiento.

Los pacientes del GI ($n = 14$) que no superaron la PODCCP en T2, vieron aumentada su dosis umbral puntual media de una dosis basal de 100,8 mg de proteína clara de huevo (DE 96,3 mg) a 481,3 mg (DE 417,5 mg) en T2 ($P = 0,002$). Además, esta dosis fue significativamente mayor que la dosis umbral de los pacientes del CG en T2 (media 256,2 mg, DE 425,3 mg) ($P = 0,02$). Los pacientes del GC mostraron un aumento no significativo de su umbral basal (media 218,3 mg, DE 405,5 mg) en T2 (media 256,2 mg, DE 425,3 mg) ($P = 0,41$) (Figura 8).

No hubo diferencias significativas en la dosis umbral basal entre los pacientes del GI que no pasaron la PODCCP en T2 (media 100,8 mg, DE 96,3 mg) y los pacientes del CG (media 218,3 mg, DE 405,5 mg) ($P = 0,29$). Tampoco hubo diferencias significativas en la dosis umbral basal entre los pacientes del GI que no superaron la PODCCP en T2 (media 100,8 mg, DE 96,3 mg) y los pacientes del GI que sí la superaron (media de 135 mg, DE 171 mg) ($P = 0,98$).

Figura 8. Cambios en la dosis umbral puntual media de los pacientes del GI y GC que no superaron la PODCCP con CHD en T2.



GI, grupo de intervención (N=14); **GC**, grupo control (N=31); **T0**, Tiempo 0 (basal); **T2**, Tiempo 2 (4 meses después del inicio del estudio).

5.2.2.2. Grupo de intervención 2 (GI2)

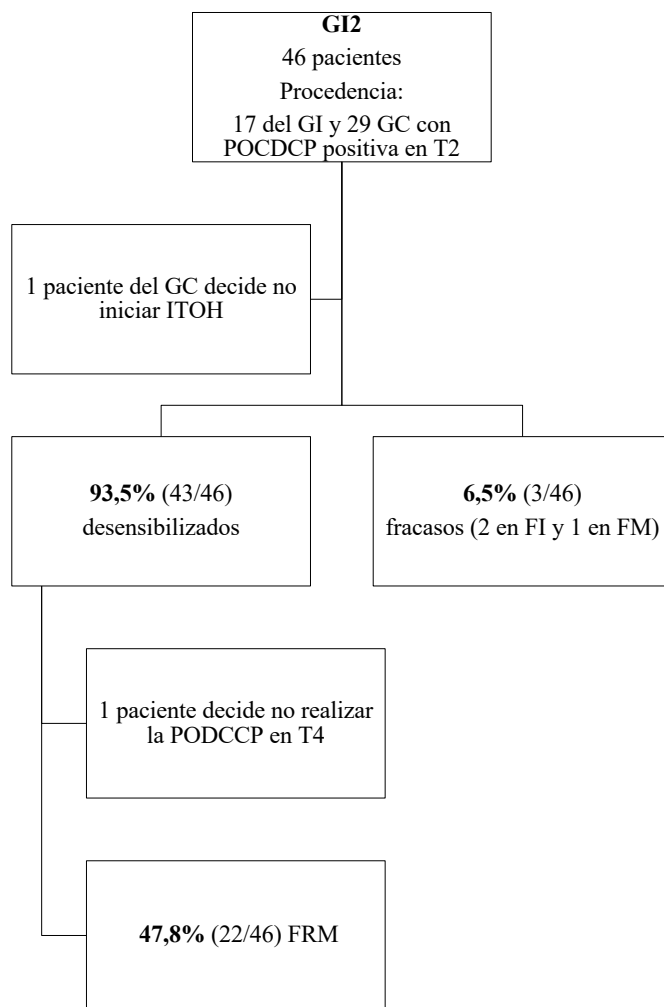
El grupo GI2 estuvo formado por 46 sujetos (17 pacientes del GI y 29 del GC) que tuvieron una PODCCP positiva en T2 (Figura 9). Los padres de un niño del GC decidieron no participar en el GI2 y posponer el inicio de la ITOH. El GI2 recibió ITOH siguiendo el protocolo modificado descrito anteriormente, comenzando por la última dosis tolerada en la PODCCP. El 93,5% (43/46) de los pacientes alcanzaron la desensibilización. Hubo un 6,5% (3/46) de fracasos por RAs repetidas durante la ITOH (2 pacientes en la FI y 1 paciente en la FM). La duración media de la FI fue de 35 días (DE 18,01). Uno de los pacientes que completó con éxito el tratamiento de ITOH no acudió a realizar la PODCCP en T4. El 47,8% (22/46), por análisis de intención de tratar, pasaron la PODCCP y alcanzaron la TP en T4.

Los pacientes del GI2 que no superaron la PODCCP en T4 tras haber seguido un mes de dieta de exclusión (43,5%, 20/46), aumentaron su dosis umbral puntual media, de 381,5

mg (DE 555,65) de proteína de clara de huevo en T2 a 1332 mg (DE 1017,43) en T4 ($P < 0,001$).

El 88,5% (54/61) de los pacientes que iniciaron el ensayo clínico, de acuerdo con el análisis por intención de tratar, estaban desensibilizados en T3.

Figura 9. Diagrama de flujo y distribución de los pacientes del GI2.



GI, grupo de intervención; **GI2**, grupo de intervención 2; **GC**, grupo control; **PODCCP**, prueba de exposición oral doble ciego controlada con placebo; **T4**, 19 meses después del inicio de la ITOH, tras 1 mes de dieta de evitación.

En el 8,2% (5/61) de los sujetos el tratamiento de ITOH fracasó, en el 6,6% (2/30) a los 3 meses (GI) y en el 6,5% (3/46) entre los 4 y los 19 meses (GI2)

El 54,1% (33/61) de los participantes, de acuerdo con el análisis por intención de tratar, alcanzaron la TP entre los 4 y los 19 meses del inicio de la ITOH. El resto de los pacientes desensibilizados que no alcanzaron la TP a los 19 meses, el 34,4% (21/61), tras completar una nueva FI iniciada desde la última dosis tolerada en la PODCCP, continuaron tomando regularmente productos alimentarios que contenían huevo crudo, cocido o calentado y al menos 2 huevos poco cocinados por semana.

5.2.3. Seguridad de la ITOH

A continuación, se describen las RAs que se produjeron en las diferentes fases de la ITOH en los GI y GI2.

5.2.3.1. Reacciones adversas en el GI

El 70% (21/30) de los pacientes del GI sufrieron RAs en algún momento de la ITOH y se produjeron en el 5,9% del total de las dosis administradas.

Hubo 145 RAs: 21 (14,5%) en la FIR, 79 (54,5%) en la FIL y 45 (31%) en la FM en el 70% (21/30) de los pacientes. En la Tabla 11 se describen la dosis de tratamiento asociadas a síntomas durante la ITOH (número y gravedad) hasta T2.

5.2.3.1.1. Fase de inducción rápida

El 14,5% (21/145) de las RAs se produjeron en la FIR. Durante esta fase hubo RAs en el 70% (21/30) de los pacientes, que corresponden al 5,9% (21/358) de las dosis administradas durante la FIR.

Se produjeron RAs en el 70% (21/30) de los pacientes, que corresponden al 5,9% (21/358) de las dosis administradas durante esta fase. Las dosis que desencadenaron reacciones durante este día fueron los siguientes: 140 mg (23,8%, 5/21), 70 mg (23,8%, 5/21), 35 mg (19,0%, 4/21), 17 mg (9,5%, 2/21), 9 mg (9,5%, 2/21), 5 mg (4,8%, 1/21), 2 mg (4,8%, 1/21) y 1 mg (4,8%, 1/21). Ningún participante reaccionó con las dosis de 0,08, 0,2, 0,3 y 0,5 mg.

Los síntomas más frecuentes durante esta fase fueron: Síntomas orofaríngeos (57,1%, 12/21), síntomas gastrointestinales (57,1%, 12/21), rinitis (57,1%, 12/21), urticaria generalizada (0%, 0/21) y dificultad respiratoria (0%, 0/21) (Tabla 11).

Tabla 11. Reacciones adversas durante la ITOH en GI.

Variable		FIR	FIL	FM	Todos
Pacientes con síntomas - no. (%)		21 (70%)	16 (53,3%)	10 (33,3%)	21 (70%)
Total de Dosis - no.		358	1300	792	2450
Cualquier síntoma - no. (% de dosis por fase)		21 (5,9%)	79 (6,1%)	45 (5,7%)	145 (5,9%)
Tipo de síntoma - no. (% de dosis por fase)	SOF	12 (3,4%)	17 (1,3%)	24 (3%)	53 (2,2%)
	Urticaria	0	3 (0,2%)	4 (0,5%)	7 (0,3%)
	generalizada				
	Rinitis	12 (3,4%)	9 (0,7%)	11 (1,4%)	32 (1,3%)
	Dificultad respiratoria leve	0	5 (0,4%)	0	5 (0,2%)
	Gastrointestinales	12 (3,4%)	65 (5%)	20 (2,5%)	97 (4%)
Gravedad - no. (% de dosis con cualquier síntoma por fase)	Leve	21 (100%)	76 (96%)	45 (100%)	142 (98%)
	Moderada	0	3 (4%)	0	3 (2%)
	Grave	0	0	0	0
Tratamiento con adrenalina -no. (% de dosis por fase)		0	1 (0,08%)	0	1 (0,04%)

FIR, fase de incremento de dosis rápida; **FIL**, fase de incremento de dosis lenta; **FM**, fase de mantenimiento; **SOF**, síntomas orofaríngeos.

5.2.3.1.2. Fase de inducción lenta

El 54,9% (79/145) de las RAs se produjeron en la FIL. Durante esta fase hubo RAs en el 53,3% (16/30) de los pacientes, que corresponden al 6,1% (79/1300) de las dosis administradas durante la FIL.

Hubo síntomas gastrointestinales en el 82% (65/79) de las RAs, SOF en el 21,5% (17/79), rinitis en el 11,4% (9/79), dificultad respiratoria leve en el 6,3% (5/79) y urticaria generalizada en el 3,8% (3/79). Un paciente requirió adrenalina en esta fase debido a rinitis, urticaria y dificultad respiratoria leve tras recibir una dosis de 2404 mg. En este caso, debido a la intensidad de la reacción, el protocolo se modificó y la dosis de huevo se redujo en un 50%. Toleró la nueva dosis todos los días durante 1 semana. Se realizaron aumentos adicionales siguiendo el protocolo sin producirse reacciones. Dos pacientes (7%) fueron retirados del estudio por RAs repetidas no graves (dolor abdominal y vómitos) durante la FIL. Ante la sospecha de que ambos hubiesen desarrollado esofagitis eosinofílica secundaria a la ITOH, se propuso realizar una endoscopia esofágica que los padres rechazaron realizar. Dichos pacientes tenían niveles de sIgE-C de 5,6 y 245 kU/L, respectivamente.

5.2.3.1.3. Fase de mantenimiento

El 31,0% (45/145) de las RAs se produjeron en la FM. Durante esta fase hubo RAs en el 33,3% (10/30) de los pacientes, que corresponden al 5,7% (45/792) de las dosis administradas durante la FM.

Todas las reacciones fueron leves; hubo síntomas gastrointestinales en el 44% (20/45) de las RAs, SOF en el 53% (24/45), rinitis en el 24% (11/45) y urticaria generalizada en el 9% (4/45).

El 57,1% (16/28) de los pacientes del GI que completaron el tratamiento en T2 declararon o admitieron que no les gustaba el sabor y/o la textura del huevo crudo. Sin embargo, continuaron tomando el huevo de acuerdo con el protocolo indicado.

Los niveles basales de sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM (kU/L) fueron más elevados entre los pacientes del GI que sufrieron ≥ 1 RAs (70%, 21/30) en cualquiera de las fases (FIR, FIL o FM) de la ITOH (mediana y rango: 11,9 [1-245], 8,2 [0,7-185] y 8,6 [0,7-162], respectivamente) que en aquellos que no tuvieron RAs (30%, 9/30) (mediana y rango: 4,0 [1-11,5], 4,9 [0,7-15,5] y 4,7 [0,7-15,5], respectivamente) ($P < 0,05$).

5.2.3.2. Reacciones adversas en el GI2

El 58,7% (27/46) de los pacientes del GI2 presentaron ≥ 1 RAs durante la ITOH. El 6,5% de los pacientes (3/46) fueron retirados del estudio por RAs repetidas (rinitis, vómitos y dolor abdominal), uno durante la FI y dos en la FM.

Se produjeron RAs en el 5,3% de las 10.970 dosis administradas. El 99,7% (584/586) fueron RAs leves (59,2% SOF, 37,1% síntomas digestivos, 2,4% urticaria y 1,2% rinitis). Hubo una reacción moderada (urticaria generalizada, rinitis y dificultad respiratoria leve) y una reacción grave (urticaria generalizada y dificultad respiratoria grave). En ambos casos fue precisa la administración de una dosis de adrenalina. La RA grave se produjo en una paciente que seguía la FM, tomó un AINE (ibuprofeno) y alcohol una hora después de ingerir una dosis de huevo. Se indicó que evitara la toma de AINE y la toma de alcohol en las 3 horas previas y posteriores a la toma de huevo. De esta manera pudo continuar el tratamiento de ITOH sin que se produjeran nuevas RAs.

El 58,7% (27/46) de los pacientes del GI2 que completaron con éxito la ITOH declararon que no les gustaba el huevo. Los motivos referidos fueron el rechazo al aspecto, textura y/o sabor del alimento, y el temor a sufrir una reacción alérgica tras ingerir el alimento.

5.2.4. Cambios inmunológicos

El estudio y valoración de los cambios inmunológicos se realizó en el grupo activo GI y en el GC.

Se observó una disminución significativa en el tamaño de las PC para clara de huevo, OVA y OVM en el GI de T0 (basal) a T2 (4 meses después de T0) ($P = 0,001$) (Tabla 12). El tamaño de las PC en T2 fue menor en el GI que en el GC, con una diferencia significativa para OVA y OVM.

También hubo una disminución en los niveles de sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM en el GI de T0 a T2, que solo fue significativa para la sIgE-OVA ($P < 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la sIgE a los diferentes alérgenos entre el GI y el CG en T2. Se produjo un aumento significativo en los niveles de sIgG₄-C en el GI de T0 a T2 ($P < 0,001$). La sIgG₄-C también fue significativamente superior en GI respecto a GC en T2 ($P = 0,001$).

Tabla 12. Evolución del diámetro mediano de pápula de las pruebas cutáneas y de los niveles de IgE e IgG₄ sérica específicas en los grupos GI y GC.

	GI			GC			GI vs GC T2 P
	T0	T2	P	T0	T2	P	
PC (mm) mediana (rango)*							
CH	6 (3-11)	5 (3-8)	0,001	6 (3-12)	5,5 (0-13)	0,45	0,6
OVA	5 (0-9)	3 (0-8)	0,001	5 (0-13)	4 (0-11)	0,02	0,03
OVM	5,5 (0-11)	3,5 (0-9)	0,001	6 (0-11)	5,5 (0-14)	0,14	0,02
sIgE (kU/L) mediana (rango)							
CH	6,4 (1-245)	3,1 (0,5-432)	0,15	2,2 (0,7-73)	2,2 (0,4-60,2)	0,47	0,31
OVA	6,3 (0,7-185)	2,2 (0,3-192)	<0,001	2,2 (0,7-43,5)	1,3 (0,3-32,3)	0,01	0,28
OVM	3,1 (0,7-162)	2,1 (0,3-163)	0,11	2,3 (0,7-89,1)	1,7 (0,3-76,7)	0,17	0,31
sIgG₄ (mg/L) mediana (rango)							
CH	0,4 (0,1-6,2)	4,4 (0,1-30)	0,0001	0,2 (0,1-3,6)	0,4 (0,1-7,5)	0,02	0,001

Extractos comerciales.* **CH, clara de huevo; **PC**, prueba cutánea; **GI**, grupo de intervención; **GC**, grupo control; **OVA**, ovoalbúmina; **OVM**, ovomucoide; **sIgE**, IgE sérica específica; **sIgG₄**: IgG₄ sérica específica; **T0**, tiempo basal; **T2**, 4 meses después de T0.

Los niveles de sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM en el GI en T1 (3 meses después de T0) fueron más bajos entre los pacientes que superaron la PODCCP en T2 que aquellos en los que la prueba resultó positiva ($P < 0,02$) (Tabla 13). No hubo diferencias en el tamaño de las PC ni en los niveles de sIgG₄-C en T1, aunque sí un aumento de estos últimos, entre los pacientes que tuvieron una PODCCP positiva en T2 y los que tuvieron una prueba negativa.

Tabla 13. Parámetros inmunológicos del GI en T1 de acuerdo con los resultados de las PODCCP en T2.

GI			
Parámetros inmunológicos en T1	PODCCP en T2		
	Negativa (N = 11)	Positiva (N = 17)*	P
PC mm			
mediana (rango)			
CH	4,5 (3-8)	4,5 (3-8)	0,76
OVA	3 (0-4)	3 (3-7,5)	0,13
OVM	3 (0-9)	3 (0-6,5)	0,67
sIgE kU/L			
mediana (rango)			
CH	1,8 (0,7-9,3)	9,1 (1-58,8)	0,001
OVA	0,8 (0-6,7)	4,2 (0,3-29,8)	0,02
OVM	0,6 (0-6,7)	6,4 (0-49,7)	0,004
sIgG ₄ mg/L			
mediana (rango)			
CH	3.2 (0.4-25.7)	6.9 (0.7-30)	0.53

*Los datos incluyen los tres pacientes del GI que no completaron la fase de mantenimiento en 3 meses y no realizaron la PODCCP en T2. **CH**, clara de huevo; **GI**, grupo de intervención; **PC**, prueba cutánea; **OVA**, ovoalbúmina; **OVM**, ovomucoide; **sIgE**, IgE sérica específica; **sIgG₄**, IgG₄ sérica específica; **T1**, 3 meses después de T0; **T2**, 1 mes después de T1.

Los niveles de sIgE-C y sIgE-OVA en el GI2 en T3 (18 meses después de T2) fueron más bajos entre los pacientes que superaron la PODCCP en T4 (1 mes después de T3) que aquellos en los que la prueba resultó positiva ($P = 0,04$) (Tabla 14). No hubo sin embargo diferencias en los niveles de sIgE-OVM en T3.

Tabla 14. Parámetros inmunológicos del GI2 en T3 de acuerdo con los resultados de las PODCCP en T4.

GI2			
Parámetros inmunológicos en T3	PODCCP en T4		
	Negativa (N = 22)	Positiva (N = 21)	<i>P</i>
sIgE kU/L			
mediana (rango)			
CH	0,83	4,42	0,03
OVA	0,58	2,93	0,04
OVM	0,54	0,98	0,93

CH, clara de huevo; **GI**, grupo de intervención; **PC**, prueba cutánea; **OVA**, ovoalbúmina; **OVM**, ovomucoide; **sIgE**, IgE sérica específica; **sIgG₄**, IgG₄ sérica específica; **T3**, 18 meses después de T2; **T4**, 1 mes después de T3.

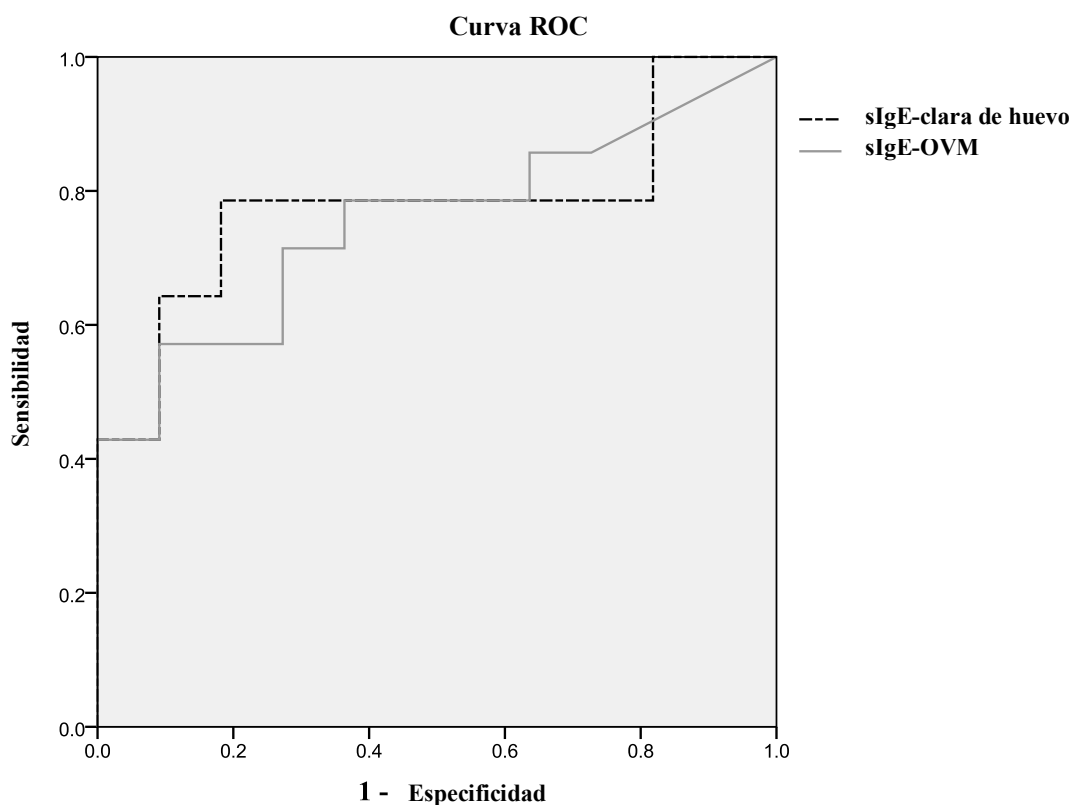
5.2.5. Identificación de los factores predictores de TP

La edad al inicio del ensayo, el sexo, la historia de asma, los antecedentes de anafilaxia tras la ingestión de huevo, la frecuencia y gravedad de las RAs durante la ITOH, y la dosis que desencadenó los síntomas en la PODCCP al inicio del estudio, no fueron predictores potenciales del resultado de la PODCCP a los 4 meses ni a los 19 meses.

Se investigó la capacidad de la sIgE en T1 para determinar el resultado de la PODCCP en T2, así como los puntos de corte de sIgE que predijeran mejor el resultado de dicha prueba, al haberse observado una diferencia significativa en los niveles de sIgE de los pacientes del GI entre T1 (antes de iniciar la dieta de evitación) y T2 (momento en el que se realizó la PODCCP).

La sIgE-C y la sIgE-OVM en T1 mostraron el mejor rendimiento diagnóstico para predecir el resultado de la PODCCP en T2. El área bajo la curva para sIgE-C y sIgE-OVM fue de 0,78 ($P = 0,02$) y 0,75 ($P = 0,03$), respectivamente (Figura 10). El área bajo la curva para la sIgE-OVA no fue estadísticamente significativa. El punto de corte que mostró los mejores valores para predecir el resultado de la PODCCP en T2 fue 7,1 kU/L para sIgE-C y 1,7 kU/L para sIgE-OVM. La probabilidad de que el resultado de la PODCCP fuese positivo

con valores de sIgE-C o sIgE-OVM por encima del punto de corte, fue del 90% y 73%, respectivamente. Por otro lado, la probabilidad de pasar la PODCCP si los niveles de sIgE-C o sIgE-OVM estaban por debajo del punto de corte era del 67% y 70%, respectivamente.



	Valor	Sensibilidad %	Especificidad %	IC 95%	VPP%	VPN%	LR	Valor <i>P</i>	IY	AUC
sIgE-C	7,1	64	91	59% a 97%	90	67	7,07	0,019	0,55	0,78
sIgE-OVM	1,7	79	73	56% a 95%	73	70	2,16	0,03	0,42	0,75

Figura 10. Potencial discriminativo de la IgE sérica específica a los 3 meses de comenzar la ITOH en el resultado de la PODCCP a los 4 meses (1 mes después de suspendida la ITOH). Las curvas ROC se muestran en la figura. Los puntos de corte óptimos para la sIgE-C y la sIgE-OVM se muestran en forma de tabla. **C**, clara de huevo; **OVM**, ovomucoide; **VPP**, valor predictivo positivo; **VPN**, valor predictivo negativo; **LR**, relación de verosimilitud; **IC**, intervalo de confianza; **IY**, índice de Youden; **AUC**, área bajo la curva; **sIgE**, IgE sérica específica.

5.3. Análisis de citoquinas Th1 y Th2 en suero durante la ITOH

Se realizaron determinaciones de citoquinas Th1 y Th2 en el suero de 7 pacientes del GI durante diferentes fases de la ITOH: en T0, T1 y a los 12 y 18 meses del inicio de la ITOH. Dichos pacientes no padecían otras enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, alergia a otros alimentos distintos al huevo, asma ni rinitis) que pudiesen interferir en la evolución de los niveles de citoquinas durante el periodo de análisis.

Se observó una disminución estadísticamente significativa entre T0 y T1 de la IL-1b ($P = 0,043$) y la IL-12(p70) ($P = 0,046$), y entre T0 y 12 meses de la IL-5 ($P = 0,043$) y de la relación de citoquinas Th2/Th1 ($P = 0,043$).

Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la evolución del resto de citoquinas analizadas por separado ni para la relación Th2/Th1 en los siguientes periodos: T0 a T1, T0 a 18 meses, T1 a 12 meses, T1 a 18 meses ni de 12 a 18 meses.

Al no ser detectados cambios significativos se decidió realizar un segundo análisis ajustando la técnica de medición según indicaciones del fabricante (ver Métodos, apartado 4.8.5.). En este estudio fueron analizados los niveles séricos de diferentes citoquinas entre T0 y T1, T0 y 12 meses, y T0 y 18 meses: Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Treg (IL-10), y relación de citoquinas Th2/Th1 (IL-4+IL-5+IL-10+IL-13/IFN- γ).

Para dicho estudio se utilizó suero de los mismos pacientes del primer ensayo de citoquinas. La Tabla 15 muestra la significación estadística (P) de las diferencias observadas en los niveles de citoquinas entre los tiempos analizados. No se observaron diferencias significativas entre la media de los niveles en los diferentes tiempos. Se observó únicamente un descenso significativo de la IL-5 de T0 a 18 meses ($P = 0,046$).

Tras los resultados obtenidos en los dos ensayos se decidió no ampliar el estudio al resto de pacientes que habían completado con éxito el tratamiento de ITOH. Dichos pacientes padecían otras patologías alérgicas activas que se consideró podrían afectar a la concentración de las diferentes citoquinas con independencia del efecto de la ITOH.

Tabla 15. Análisis de citoquinas Th2 y Th1 (2º ensayo de laboratorio). Significación estadística (*P*) de las diferencias en los niveles de citoquinas entre los tiempos estudiados.

	T0 a T1	T0 a 12 meses	T0 a 18 meses
IFN-γ	1	0,08	0,249
IL-4	0,109	0,180	0,593
IL-5	0,237	0,08	0,046
IL-10	0,715	0,345	0,249
IL-13	0,465	0,06	0,249
Relación Th2/Th1	0,435	0,431	0,323

T0, basal; *T1*, 3 meses después de T0.

5.4. Seguimiento a largo plazo

En el seguimiento a largo plazo fueron incluidos los pacientes de los grupos GI y GI2 que completaron con éxito las fases de inducción y mantenimiento de la ITOH.

En el seguimiento a 7 años, el 88,5% (54/61) de los sujetos incluidos en el ensayo clínico y que completaron con éxito la ITOH seguían tomando huevo en diferentes formas (Tabla 16). El 64% (39/61) eran varones y la edad mediana al finalizar el análisis fue de 16 años (rango 12-25).

A los 19 meses del inicio del estudio el 34,4% (21/61) de los pacientes estaban desensibilizados, pero aún no habían alcanzado la TP. De ellos, el 47,6% (10/21) alcanzaron la TP en el periodo comprendido entre los 19 meses y los 7 años del inicio de la ITOH. Como se ha indicado, el criterio seguido para evaluar la TP fue que los valores de sIgE-C y sIgE-OVM fuesen inferiores a los puntos de corte identificados como mejores predictores de resultado de la PEOC tras dieta de evitación (apartado 5.2.5.). Todos los pacientes (10/10)

que cumplieron dicho criterio a lo largo del seguimiento entre los 19 meses y 7 años del inicio del estudio superaron la PEOC.

En resumen, el 70,5% (43/61) de los pacientes (según el análisis por intención de tratar) alcanzó la TP a lo largo de todo el estudio. El 18,0% (11/61) estaban aún en FM, desensibilizados y consumiendo huevo poco cocinado al menos 2 veces a la semana.

Tabla 16. Resultados de eficacia de la ITOH para desensibilización y TP en los diferentes tiempos del estudio.

	T1	T2	T3	T4	T5
Desensibilización	93,3% (28/30)		88,5% (54/61)		88,5% (54/61)
TP		36,7% (11/30)		54,1% (33/61)	70,5% (43/61)
Fracaso	6,7% (2/30)		8,2% (5/61)		8,2% (5/61)

Análisis por intención de tratar. **TP**, tolerancia permanente. De los 61 pacientes, 2 pacientes del GC no siguen ITOH, uno porque superó la PODCCP en T2 y otro cuyos padres decidieron no seguir el tratamiento. **T0**, basal; **T1**, 3 meses después de T0; **T2**, 1 mes después de T1; **T3**, 18 meses después de T2; **T4**, 1 mes después de T3; **T5**, 7 años después de T0.

A los 7 años de seguimiento, los niveles de sIgE-huevo, sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM eran significativamente inferiores en los pacientes con TP que en los pacientes desensibilizados (Tabla 17). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de sIgG4-C entre ambos grupos.

Tabla 17. Niveles de sIgE y sIgG4 de los pacientes tratados con éxito tras 7 años de seguimiento.

GI-GI2	Desensibilizados (N=11)	TP (N=43)	P
sIgE mediana kU/L (rango)			
Huevo	2,8 (0,2-34,3)	0,8 (0,01-13,3)	0,023
Clara de huevo	2,5 (0,2-33,8)	0,6 (0,01-12,3)	0,023
OVA	1,4 (0,08-10,1)	0,4 (0,01-6,09)	0,012
OVM	2 (0,1-44,3)	0,4 (0,01-6,5)	0,011
sIgG4 mediana mg/L (rango)			
Clara de huevo	4,3 (0,9-6,3)	5,1 (0,06-31)	0,22

TP, tolerancia permanente; **GI-GI2**, grupos de intervención; **OVA**, ovoalbúmina; **OVM**, ovomucoide; **sIgE**, IgE sérica específica; **sIgG4**: IgG4 sérica específica.

El 90,7% (49/54) de las familias de los pacientes que completaron con éxito la ITOH respondieron al cuestionario telefónico realizado a los 7 años del inicio del tratamiento. El 9,3% (5/54) no pudo ser contactado. El 81,6% (40/49) de los pacientes contactados había alcanzado la FMR, frente al 18,4% (9/49) que se mantenía solamente desensibilizado. Durante este periodo, el 14,3% de los sujetos refirió que tuvo RAs relacionadas con la ingestión de huevo, el 15,0% (6/40) de los pacientes del grupo de TP y el 11,1% (1/9) de los pacientes que estaban desensibilizados. Todas las RAs descritas fueron leves.

El 71,4% (35/49) de los pacientes consumía huevo al menos 3 veces por semana, el resto lo hacía con menor frecuencia. El 69,4% (34/49) consumía alimentos elaborados con huevo crudo (salsas, helados, cremas), huevo poco cocinado (frito, revuelto, pasado por agua, tortilla) y muy cocinado (rebozados, bollería, bizcocho) regularmente. El 22,4% (11/49) consumía fundamentalmente huevo muy cocinado y el 8,2% (4/49) consumía casi exclusivamente alimentos que contenían pequeñas cantidades de huevo. No se observaron diferencias significativas en el consumo de huevo poco cocinado, ni de alimentos que

contuviesen huevo crudo, ni diferencias en la frecuencia de consumo semanal durante la fase de mantenimiento entre los pacientes desensibilizados y los pacientes con TP. El 42,9% (21/49) de los pacientes declararon/admitieron que les disgustaba el sabor y/o la textura del huevo poco cocinado, pero que tenían buena adherencia al tratamiento.

El 14,3% (7/49) de los sujetos que respondieron a la encuesta telefónica refirió haber tenido RAs relacionadas con la ingestión de huevo durante la FM. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Cabe señalar que ninguno de los pacientes con TP que presentó RAs dejó de consumir huevo regularmente. La mayor parte de las RAs fueron leves. Un 63% de las RAs consistieron en síntomas digestivos, un 38% en síntomas locales y un paciente del grupo de desensibilizados sufrió una reacción anafiláctica (urticaria generalizada y síntomas leves de broncoespasmo). En el 33% de las RAs fue identificado algún cofactor como participante de la reacción. El más frecuente fue el ejercicio físico, implicado en el 66% de los casos. El segundo cofactor en importancia fue la toma de AINE, que intervino en una reacción. Solamente el 6,1% (3/49) de los participantes cumplía las recomendaciones sobre cofactores dadas en consulta y recordadas en cada visita de revisión. Por otro lado, el 71% había dejado de llevar consigo el dispositivo de adrenalina autoinyectable prescrito.

Todos los pacientes manifestaron en el cuestionario telefónico sentirse satisfechos por haber realizado el tratamiento de ITOH. A pesar de este dato, el 14% de los pacientes relató que presentaba cierto grado de ansiedad al consumir huevo por temor a tener una reacción. Sin embargo, el 16% afirmó que tenía miedo de volver a tener alergia al huevo si dejaba de consumir el alimento. La familia de un paciente se arrepintió de haber realizado la ITOH debido al riesgo implícito del procedimiento. Sin embargo, el 100% de los padres recomendaría la ITOH a otros pacientes.

6

Discusión de resultados

El resultado tanto de las pruebas *in vivo* como de las pruebas *in vitro*, demostró que la CHD mantiene la alergenicidad de las proteínas del huevo en comparación con la CHC. No se observaron diferencias significativas ni en las dosis que desencadenaron síntomas durante las PEOC que fueron positivas con ambas fuentes alergénicas, ni en los síntomas observados durante las mismas. Los resultados de la inmunotransferencia de IgE y la inhibición de la inmunotransferencia de IgE revelaron que la CHD mantiene intactos sus alérgenos.

Se ha debatido largamente sobre qué fuente alergénica, cruda o cocida, debe ser utilizada en las PEOC para el diagnóstico de la alergia al huevo (Nowak-Wegrzyn y cols., 2009). Osborne y cols. (Osborne y cols., 2011) demostraron que, en una población de pacientes con alergia al huevo crudo diagnosticada mediante prueba de exposición oral, hasta el 80,3% de los pacientes toleraban el huevo en una preparación horneada. Se sabe, además, que los pacientes con niveles más bajos de IgE superan las PEOC con huevo cocinado con mayor probabilidad (Leonard y cols., 2012). Sin embargo, estos pacientes pueden seguir reaccionando frente a las proteínas del huevo en su forma cruda o poco cocinada y permanecer durante varios años en riesgo de presentar una reacción alérgica al exponerse a alimentos que contiene huevo crudo (ej. pasteles, mayonesa casera, salsas, pasteles, merengues o helados) (Eigenmann y cols., 2000). La alergenicidad de algunas de las proteínas del huevo depende de su resistencia al calor (Mine y cols., 2008). El ovomucoide es altamente estable al calor, mientras que la ovoalbúmina es relativamente lábil frente al mismo (Hirose y cols., 2004). Así, la exposición de la ovoalbúmina a una temperatura de 80 °C durante 3 minutos disminuye su actividad de unión a la IgE en un 90% (Mine y cols., 2002, Bernhisel-Broadbent y cols., 1994). Urisu y cols. (Urisu y cols., 1997) analizaron el resultado de las PEOC realizadas a pacientes con valores elevados de IgE frente a clara de huevo con el objetivo de comparar la alergenicidad de tres preparaciones diferentes de clara de huevo. El estudio mostró que el tratamiento térmico (90 °C durante 60 min) redujo la actividad alergénica de la clara de huevo. De hecho, el 55% (21/38) de los pacientes con reacciones inmediatas positivas a una clara de huevo liofilizada tuvieron respuestas negativas a la clara de huevo calentada.

En el presente estudio, observamos que el doble tratamiento térmico (pasteurización y deshidratación) a la que es sometida la clara de huevo no afecta a la alergenicidad de las proteínas de la CHD o su capacidad para unirse a la IgE. Por lo tanto, la CHD puede usarse

como fuente alérgica en las PEOC sin el riesgo de que se produzcan falsos negativos que podrían ocurrir en pacientes alérgicos a proteínas lábiles del huevo que toleren el huevo cocinado, pero no alimentos que contienen huevo crudo. Los resultados del estudio son consistentes con los obtenidos por Jurado-Palomo y cols. (Jurado-Palomo y cols., 2010), que no encontraron diferencias en la alergenicidad en los estudios *in vitro* ni *in vivo* entre la clara de huevo cruda y la clara de huevo pasteurizada. El presente estudio demuestra además que el segundo tratamiento térmico aplicado tras la pasteurización - la deshidratación con aire a 80 °C durante 1 minuto - no afecta a la alergenicidad de las proteínas de la CHD.

Por otro lado, el huevo crudo puede contaminarse con patógenos como la *Salmonella enteritidis*, siendo este un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades transmitidas por los alimentos (Guard-Petter y cols., 2001). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha demostrado que, en la Unión Europea, el huevo sigue siendo la fuente más frecuentemente implicada en la salmonelosis humana transmitida por los alimentos. *Salmonella enteritidis* es el único patógeno humano que contamina los huevos de manera rutinaria (Anonymous 2008). Una de las intervenciones clave para prevenir la contaminación y el crecimiento de *Salmonella spp.* en los huevos, es la educación de los consumidores y los trabajadores de alimentos sobre el riesgo de consumir huevos crudos o poco cocidos (Braden y cols., 2006). Los profesionales sanitarios deben manipular los alimentos de la manera más segura posible para evitar su contaminación y deterioro. Por estos motivos, el huevo crudo debería ser evitado en las PEOC y sustituido por fuentes microbiológicamente seguras como el huevo pasteurizado líquido o el huevo deshidratado. La CHD, a través de los procesos de pasteurización y deshidratación, garantiza la seguridad microbiológica del producto eliminando el riesgo de intoxicación alimentaria, incluso en comparación con otros productos en polvo como el huevo liofilizado que no es sometido a pasteurización (Matsuoka y cols., 2004).

La CHD tiene una vida útil de 18 meses y no necesita refrigeración, mientras que la clara de huevo pasteurizada tiene una vida útil de 3 días después de abrir el envase y necesita refrigeración. El producto es fácil de preparar y permite preparar dosis homogéneas, cuantificar de manera precisa las proteínas por dosis y preparar con sencillez las pruebas de exposición en ciego.

Esta es la primera vez que se demuestra que la alergenicidad de una clara de huevo deshidratada disponible comercialmente es equivalente a la del huevo crudo. La CHD puede usarse como fuente alergénica en las pruebas de exposición oral para el diagnóstico de cualquier paciente con alergia al huevo, incluidos aquellos que son alérgicos a las proteínas termolábiles del huevo. Además, la CHD elimina el peligro de toxoinfección por *Salmonella* spp. Finalmente, puede tener ciertas ventajas sobre la clara de huevo pasteurizada, como una larga vida útil sin refrigeración, y la homogeneidad de las dosis preparadas.

El ensayo clínico ha demostrado que el protocolo de ITOH empleado puede producir tolerancia permanente en pacientes con alergia persistente a huevo con una mediana de edad de 8 años y una mediana de IgE sérica específica a clara y ovomucoide de 6,4 y 3,1 kU/L, respectivamente, en un periodo de tratamiento de 3 meses. El 36,7% (11/30) de los pacientes alcanzaron este estado tras 3 meses de tratamiento en comparación con el 3,2% (1/31) del GC que siguieron una dieta de evitación durante el mismo periodo y alcanzaron la tolerancia al alimento de manera espontánea. Los pacientes que desarrollaron tolerancia permanente continuaron tomando el huevo *ad libitum*. Los resultados muestran que una proporción de pacientes con alergia persistente al huevo puede alcanzar un estado de tolerancia permanente tras un corto período de tratamiento. Además, el porcentaje de pacientes que recibieron ITOH y obtuvieron este estado aumentó progresivamente a lo largo del tratamiento. A los 18 meses fue de un 54,1% (33/61) y a los 7 años de tratamiento de un 70,5% (43/61).

Generalmente, el objetivo principal de los ensayos de ITOH ha sido el de analizar la eficacia del tratamiento para obtener el estado de desensibilización (Buchanan y cols., 2007, Patriarca y cols., 2007, Morisset y cols., 2007, Staden y cols., 2007, Itoh y cols., 2010, Vickery y cols., 2010, García Rodríguez y cols., 2011, Burks y cols., 2012, Meglio y cols., 2013, Dello Iacono y cols., 2013, Fuentes Aparicio y cols., 2013, Caminiti y cols., 2015, Martín-Muñoz y cols., 2019). Pocos estudios han investigado la TP tras ITOH y lo han hecho tras periodos prolongados de tratamiento (Buchanan y cols., 2007, Staden y cols., 2007, Vickery y cols., 2010, Burks y cols., 2012, Caminiti y cols., 2015). Dichos estudios observaron frecuencias de tolerancia permanente en el 28-75% de los pacientes que recibieron ITOH tras una media de 21-33 meses de tratamiento. Sin embargo, si consideramos solamente los estudios controlados y aleatorizados, este porcentaje varía entre el 28% (Burks y cols., 2012) y el 36% (Staden y cols., 2007). La amplia diferencia observada

en la frecuencia de tolerancia permanente podría estar relacionada fundamentalmente con tres factores: diferencias en los niveles basales de IgE sérica frente al huevo, la dosis de huevo administrada durante la fase de mantenimiento y la duración del tratamiento de ITOH.

En nuestro grupo activo, los niveles basales medianos de IgE a clara de huevo fueron de 6,4 kU/L, valores inferiores a los reportados por los estudios de Buchanan y cols. (8,2 kU/L) (Buchanan y cols., 2007), Burks y cols. (10,3 kU/L) (Burks y cols., 2012), y Vickery y cols. (12,5 kU/L) (Vickery y cols., 2010). Por otro lado, en el protocolo utilizado en este ensayo durante la fase mantenimiento fueron administradas las dosis más altas de huevo de las publicadas hasta el momento (2808 mg de proteína), que oscilaron en los estudios mencionados anteriormente entre los 300 mg (Buchanan y cols., 2007) y los 1600 mg (Burks y cols., 2012). Este hecho pudo influir positivamente en el elevado número de participantes que alcanzaron la tolerancia permanente a los 4 meses, incluso a pesar de que la duración de la ITOH fuese menor que la del resto de los estudios.

La administración de dosis elevadas de huevo persiguió dos objetivos. Por un lado, eliminar el riesgo de reacciones alérgicas debido a la ingestión accidental de alimentos, y por otro, normalizar la dieta, es decir, que el paciente pudiese tomar libremente alimentos que contuviesen huevo además de las dosis establecidas durante la fase de mantenimiento. Sin embargo, un inconveniente del tratamiento fue que el 57,1% de los participantes que recibieron ITOH durante los tres primeros meses (49% a lo largo de todo el estudio), refirieron dificultad para tomar el huevo durante la fase de mantenimiento porque les disgustaba la apariencia, la textura y/o el sabor del alimento. Esta dificultad también ha sido observada por otros estudios (Schneider y cols., 2010) y podría suponer un riesgo para la adherencia y cumplimiento de los protocolos, sobre todo en aquellos de mayor duración.

El estado de tolerancia permanente permite a los pacientes tomar alimentos elaborados con huevo en cualquier forma o presentación, en cualquier cantidad y cuando lo deseen, sin temor a una reacción alérgica. En este estado, la indicación de tomar huevo con estricta periodicidad no es necesaria. No ocurre así con el estado de desensibilización, en el que sí es necesario que el paciente tome el alimento regularmente para mantener este estado. Sin embargo, una evitación total de los alimentos no es recomendable. En un modelo de ITO

con cacahuete se demostró que la tolerancia permanente puede ser transitoria hasta en el 50% de los casos si el periodo de evitación se prolongaba durante 6 meses (Syed y cols., 2013). En el presente estudio, solo 3 pacientes que superaron la PODCCP a los 4 meses tuvieron reacciones en los 6 primeros meses de seguimiento. Las reacciones fueron leves y se resolvieron sin tratamiento y los pacientes pudieron seguir consumiendo el huevo de forma segura durante el resto del período de seguimiento.

Durante la fase de mantenimiento, el huevo fue administrado como huevo poco cocinado para que la alergenicidad de las proteínas se viese afectada en el menor grado posible. Este punto es particularmente importante porque la administración exclusiva de huevo cocinado extensamente durante las fases de inducción y mantenimiento de la ITOH no implica que el paciente tolere la ingestión de huevo crudo. Así, Itoh y cols. (Itoh y cols., 2010) afirmaron que el 50% de los pacientes que recibieron 60 g de huevo calentado dos veces por semana durante el mantenimiento de 9 meses de la ITOH, no toleraron 1 g de huevo crudo en polvo después del tratamiento. Por lo tanto, realizar las fases de incremento de dosis y de mantenimiento con huevo crudo y/o casi crudo facilita la tolerancia de la forma más alergénica del huevo, la cruda. De esta manera, los pacientes reducen el riesgo de reacción, y como consecuencia desarrollan una mayor protección al ingerir alimentos que contienen huevo crudo.

El protocolo de ITOH también demostró ser altamente eficaz para desensibilizar a los pacientes frente al huevo en un corto periodo de tiempo, obteniéndose un éxito del 93,3% a los 3 meses. Estos porcentajes se aproximan al rango alto de las cifras de eficacia obtenidas en otros estudios y que oscilan entre el 0% y el 94% (57% Buchanan y cols., 2007, 70% Patriarca y cols., 2007, 69,4% Morisset y cols., 2007, 84% Staden y cols., 2007, 87% García-Rodríguez y cols., 2011, 75% Burks y cols., 2012, 80% Meglio y cols., 2013, 0% Dello Iacono y cols., 2013, 92% Fuentes Aparicio y cols., 2013, 94% Caminiti y cols., 2015, 93,7% Martín-Muñoz y cols., 2019). Además, en los pacientes que fueron desensibilizados, pero no alcanzaron la tolerancia permanente, se produjo un aumento significativo del umbral de tolerancia al huevo tras la ITOH, pasando de tolerar una media de 100,8 mg de proteína de huevo en la prueba basal a 481,3 mg a los 4 meses. Los datos son consistentes con los publicados por Burks y cols. (Burks y cols., 2012) que demostraron que la ITO con leche es eficaz para aumentar el umbral de tolerancia al alimento.

La generalización del uso de la ITO en la práctica clínica se ha visto lastrada por las comunicaciones de RAs durante el procedimiento (Ibáñez y cols., 2015). El 70% de los pacientes del ensayo tuvieron alguna RA a lo largo del tratamiento. Sin embargo, la tasa de RAs fue la menor de las observadas en los estudios de ITOH. El porcentaje de dosis en el que se produjeron reacciones adversas durante la ITOH, incluyendo las fases de inducción y mantenimiento, fue del 5,9% frente al de otros estudios que oscilaron entre el 7,6% (Vázquez-Ortiz y cols., 2014) y el 25% (Burks y cols., 2012) de las dosis administradas. Estas diferencias podrían estar relacionadas con un menor grado de sensibilización al alimento, con niveles de IgE específica a proteínas del huevo (IgE clara 6,1 kU/L), discretamente inferiores a los de las poblaciones de dichos ensayos, 6,44 (Vázquez-Ortiz y cols., 2014) y 10 kU/L (Burks y cols., 2012), respectivamente. En este sentido, y en concordancia con dichas observaciones, en el presente estudio se observó que los niveles basales de sIgE-C, sIgE-OVA y sIgE-OVM (kU/L) fueron más elevados entre los pacientes del GI que sufrieron ≥ 1 RAs en cualquiera de las fases de la ITOH (mediana: 11,9, 8,2 y 8,6, respectivamente) que en aquellos que no tuvieron RAs (mediana: 4,0, 4,9 y 4,7, respectivamente).

Por otro lado, podría haber factores como el asma que influyesen en la frecuencia y/o gravedad de las RAs. En nuestra población, el 41% de los participantes tenía asma, frente al 64% de los sujetos del estudio publicado por Vázquez-Ortiz y cols. (Vázquez-Ortiz y cols., 2014). Desafortunadamente, el trabajo de Burks y cols. (Burks y cols. 2012) no ofrece esta información, y no podemos determinar si la mayor frecuencia de las RAs descritas en dicho estudio pudo verse influida por una mayor frecuencia de asma entre la población tratada.

Durante el presente ensayo, más del 95% de las RAs observadas fueron leves. Además, su frecuencia y gravedad disminuyó progresivamente entre la fase de inducción rápida y la fase de mantenimiento, siendo los pacientes que precisaron más de 3 meses para lograr la desensibilización aquellos que concentraron el mayor número de reacciones. A pesar de su escasa gravedad, el 8,2% (5/61) de los pacientes tuvieron que discontinuar la ITOH por presentar RAs leves recurrentes. En dos de ellos el tratamiento fue suspendido por RAs repetidas, fundamentalmente dolor abdominal y vómitos. En base a nuestra experiencia previa en esofagitis eosinofílica relacionada con ITO con leche (Sánchez-García y cols., 2012), se propuso realizar una endoscopia esofágica. Sin embargo, los padres de los pacientes

rechazaron la prueba. Los síntomas remitieron en ambos casos tras suspender la ITOH.

Con relación a las dosis de proteína de huevo administradas durante las PODCCP, el consenso PRACTALL propone para el diagnóstico de alergia al huevo alcanzar una dosis acumula de 4443 mg de proteína para la prueba de exposición oral controlada (Sampson y cols., 2012). El objeto de dicha dosis persigue minimizar el número de resultados falsos negativos de la prueba. En el presente estudio, la dosis acumulada de proteína de huevo administrada durante las PODCCP fue de 2808 mg, dosis inferior a la propuesta por el consenso PRACTALL. A pesar de ello, los pacientes en los que la PODCCP resultó negativa a los 4 y a los 19 meses del inicio de la ITOH tras haber seguido un mes de dieta de evitación, no tuvieron RAs significativas durante el periodo de seguimiento. Solamente tres pacientes tuvieron síntomas leves y transitorios durante los primeros 6 meses, que sin embargo no les impidieron continuar tomando huevo. Por tanto, el haber realizado una prueba de exposición con dosis inferiores a las propuestas por el consenso PRATCTALL no se tradujo en la aparición de RAs frecuentes y graves tras la reintroducción del huevo en la dieta.

Los cambios en la respuesta inmune específica frente a huevo se evidenciaron, por un lado, en la disminución del tamaño de las pruebas cutáneas para clara, OVA y OVM en los pacientes del GI a los 3 meses del inicio de la ITOH. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el tamaño de la prueba cutánea entre los pacientes que tuvieron una PODCCP positiva a los 4 meses y aquellos en los que la prueba resultó negativa. En la misma línea, el estudio de Burks y cols. (Burks y cols., 2012) tampoco relacionó el tamaño de la prueba cutánea para huevo con la tolerancia permanente en el mes 24. No se apreciaron diferencias significativas ($P = 0,32$) en las pruebas cutáneas de los pacientes que tuvieron una PODCCP negativa (4 mm) y las de aquellos con una PODCCP positiva (5,5 mm).

Por otro lado, los niveles de IgE para clara, OVA y OVM a los 3 meses fueron más bajos en los pacientes que lograron la tolerancia permanente a los 4 meses (1,8, 0,8 y 0,6 kU/L, respectivamente) que en aquellos que no superaron la PODCCP (9,1, 4,9 y 6,4 kU/L, respectivamente). Esta variable no se correlacionó con la tolerancia permanente en el estudio de Burks y cols. (Burks y cols., 2012). Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los de Vickery y cols. (Vickery y cols., 2014), donde los pacientes que superaron con éxito la PEOC

realizada tras suspender una ITO con cacahuete tenían niveles más bajos de IgE a cacahuete, al inicio del estudio y en el momento de la PEOC, que los sujetos que no la superaron. En dicho estudio se planteó la hipótesis de que los niveles de IgE sérica podrían ser predictores de tolerancia permanente. En el presente estudio, los niveles de IgE a clara y ovomucoide tras 3 meses de ITOH mostraron la mejor capacidad para predecir el resultado de la PODCCP realizada 1 mes después de suspender el tratamiento. Los niveles de IgE a clara superiores a 7,1 kU/L indicaron una probabilidad del 90% de tener una PODCCP positiva. Este punto de corte para IgE es similar al punto de decisión diagnóstica propuesto por Sampson y cols. (Sampson y cols., 2001), que demostró que niveles de IgE a huevo superiores a 7 kU/L identificaban a aquellos pacientes que iban a reaccionar en una PEOC con huevo con más de un 95% de probabilidad. A pesar de ello, estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que Sampson se refirió a un procedimiento diagnóstico para pacientes de la clínica habitual, mientras que el punto de corte del presente estudio se refiere a pacientes tratados con ITOH para evaluar la tolerancia permanente.

Por lo tanto, los niveles de IgE frente a clara de huevo y ovomucoide a lo largo de la ITOH podrían utilizarse para establecer el momento más apropiado para detener el tratamiento y explorar la TP tras un período de dieta de evitación. Los niveles de IgE específica se utilizaron previamente por otros autores para programar los ascensos de dosis de la fase de incremento y, de acuerdo con nuestros datos, se podrían utilizar también para elegir, de manera personalizada, el mejor momento de la fase de manteniendo para evaluar la TP (Vickery y cols., 2010).

A los 4 meses desde el inicio del estudio se produjo un aumento significativo en el nivel de IgG₄ a clara de huevo entre los pacientes que siguieron ITOH comparado con el nivel basal. Sin embargo, a los 4 meses no fueron detectadas diferencias en los niveles de IgG₄ entre los pacientes que alcanzaron la tolerancia permanente y los pacientes que tuvieron una PODCCP positiva. Burks y cols. (Burks y cols., 2012) sí observaron que los pacientes que lograban la tolerancia permanente tenían mayores niveles de IgG₄ específica que los que no la alcanzaban. Sin embargo, en otros ensayos de ITO, como el modelo de ITO con cacahuete del estudio de Syed y cols. (Syed y cols., 2014), no se ha encontrado evidencia de cambios significativos en este biomarcador a lo largo del tratamiento.

Una de las debilidades de nuestro estudio de ITOH es la ausencia de grupo placebo. A pesar de ello, el uso de la PODCCP antes y después de la ITOH, y el proceso de aleatorización, minimizó esta debilidad. La sólida evidencia proporcionada por nuestro estudio permite su extrapolación a pacientes con un perfil similar, pero debe aplicarse con mayor prudencia en el caso de pacientes con niveles de IgE más elevados. Otra debilidad del ensayo podría ser el bajo tamaño de la muestra para evaluar los factores predictores de TP, pero teniendo en cuenta la importante diferencia en el número de pacientes que superaron la PODCCP a los 4 meses entre GI y GC (36,7% vs 3,2%, $P = 0,003$), creemos que puede ser suficiente para considerar la IgE específica como un biomarcador predictor de respuesta.

En conclusión, el protocolo de corta duración de ITOH utilizando dosis elevadas de proteínas de huevo sin modificar y de 3 meses de duración, consiguió que el 36,7% de los pacientes con alergia al huevo persistente desarrollasen tolerancia permanente. Esta estrategia fue efectiva y relativamente segura para inducir desensibilización en el 93,3% de los pacientes. El protocolo también permite a los pacientes tomar cualquier otro alimento que contenga huevo crudo, cocido o calentado durante el estado de desensibilización. Además, los niveles de IgE sérica a clara de huevo y ovomucoide a lo largo del tratamiento de ITOH podrían usarse como predictores potenciales de tolerancia permanente. Sin embargo, el estudio no observó correlación entre otras variables y el desarrollo de este estado.

La frecuencia de TP aumentó progresivamente desde el inicio de la ITOH: 36,7% a los 4 meses, 54,1% a los 19 meses y 70,5% a los 7 años. Estas cifras son más elevadas que las publicadas por el otro estudio que analizó la ITOH a largo plazo, en el que la TP a los 2 años fue del 27,5%, a los 3 años del 45% y a los 4 años del 50% (Jones y cols., 2017). Cifras también superiores a la de estudios de ITO con otros alimentos como leche (Keet y cols., 2013) y cacahuete (Vickery y cols., 2014), en los que la frecuencia de TP a los 15 meses fue del 40% y del 50% a los 5 años, respectivamente. Como se ha indicado anteriormente, los niveles de IgE sérica específica a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide de los participantes, y, por otro lado, la mayor dosis de alérgeno administrada durante la fase de manteniendo del presente estudio, pudieron contribuir a obtener unas tasas de TP mayores.

No hubo diferencias significativas entre los pacientes desensibilizados y los pacientes con TP en lo que respecta al consumo de huevo poco cocinado, al consumo de alimentos que contuviesen huevo crudo, ni diferencias en la frecuencia de consumo semanal durante la fase de mantenimiento. Al contrario de lo observado en el estudio de Jones y cols. (Jones y cols., 2016), en el que los pacientes con TP tomaban huevo con más frecuencia y lo hacían en más ocasiones en sus formas crudas y semicrudas, que los pacientes que solamente habían alcanzado la desensibilización.

Durante el diseño del presente estudio no se contempló realizar un cuestionario de CVRS. Sin embargo, a los 7 años del inicio del ensayo se realizó un cuestionario telefónico que incluyó 10 preguntas sobre satisfacción relacionada con el tratamiento de ITOH. Hemos supuesto que los tratamientos de ITO tendrían un impacto positivo en la CVRS de los pacientes y sus padres. De hecho, en los tres primeros ensayos en los que fue analizada, la evolución de las puntuaciones de los cuestionarios de CVRS, tanto de los pacientes que seguían ITO con leche (Carrano y cols., 2012), cacahuete (Anagnostou y cols., 2014) o múltiples alimentos (Otani y cols., 2014), como la de los padres, fue favorable. Sin embargo, la percepción del tratamiento puede cambiar cuando se experimentan RAs y también a causa de las restricciones derivadas de la administración de la dosis del alimento (momento del día en que es administrada, evitación de cofactores, observación tras la toma por parte de los padres) (Van der Velde y cols., 2011). En el único estudio que ha evaluado hasta el momento la CVRS de los pacientes que recibieron ITOH y la de sus padres, estos últimos reportaron una mínima mejoría en las puntuaciones de los cuestionarios (Vázquez Ortiz y cols., 2014). Sin embargo, y como contraste, los propios pacientes reportaron una importante mejora en la CVRS, con una reducción significativa en las puntuaciones de las preguntas individuales, especialmente en las referidas a restricción dietética, limitaciones derivadas de la evitación del alérgeno y temor a una reacción por exposición accidental (Vázquez Ortiz y cols., 2014).

En lo que respecta a la seguridad del procedimiento a largo plazo, no se produjo ningún nuevo fracaso entre los 19 meses y los 7 años de tratamiento. Durante este periodo, solamente 7 de los 49 sujetos que pudieron ser contactados por teléfono (14,3%) refirió RAs relacionadas con la ingestión de huevo, el 15,0% eran pacientes con TP y el 11,1% en desensibilización. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia

de RAs entre ambos grupos. La probabilidad de que se produzcan RAs en pacientes con TP ha sido también descrita por el único estudio publicado de ITOH con seguimiento a largo plazo. En dicho estudio, hasta el 17% de los sujetos con TP presentaron RAs (Jones y cols., 2016). Como contraste a ambos ensayos, un estudio de ITO con cacahuete no observó RAs en los participantes con TP tratados durante 5 años (Vickery y cols., 2014). Esta diferencia entre estudios puede deberse a un consumo irregular del alimento durante la fase de TP, que se traduzca en una pérdida temporal de la TP y se manifieste en forma de RAs (Jones y cols., 2016). En el caso particular de la ITOH, podría deberse también a un consumo exclusivo de huevo muy cocinado durante la fase de mantenimiento, actitud que puede observarse en pacientes que muestran rechazo a las presentaciones poco cocinadas (ej. tortilla, huevo frito o revuelto o huevo pasado por agua). Esta práctica puede conducir a la pérdida de desensibilización frente a las proteínas del huevo en su estado natural y provocar RAs cuando el paciente se expone a ellas.

En las recomendaciones expuestas verbalmente y entregadas por escrito a los pacientes y los padres al inicio de la FI, se indicaba que evitaran, entre otros, ciertos cofactores como el ejercicio físico y la toma de AINE. Sin embargo, en el momento de realizar el cuestionario telefónico, solo el 6% lo hacía. Esta actitud pudo estar motivada por varias causas. Por un lado, a que un tratamiento tan prolongado como la ITOH hiciera que tanto padres como pacientes perdieran el estricto cumplimiento de las medidas de evitación aconsejadas, y por otro, que observaran que los cofactores descritos no se asociaban a RAs cuando coincidían en el tiempo con la ingestión del alimento.

Durante el periodo de mantenimiento y seguimiento de la ITOH, los pacientes recibían en cada revisión una prescripción de adrenalina autoinyectable que les permitiera tratar una eventual reacción grave. La ausencia de RAs tras la ingestión de huevo durante un largo periodo de tiempo pudo motivar que solamente el 29% de los padres y pacientes llevaran consigo el dispositivo de adrenalina autoinyectable, cifra muy alejada del 70% observado en un reciente estudio que analizó las prescripciones de adrenalina autoinyectable retiradas finalmente en las farmacias por los pacientes con alergia a los alimentos (Abrams y cols., 2017).

Durante el cuestionario telefónico, todos los participantes se mostraron satisfechos con el tratamiento de desensibilización y ninguno de ellos manifestó haber preferido no seguir la ITOH excepto una familia. Sin embargo, hasta un 54% de los pacientes declararon/admitieron en algún momento de la ITOH que les disgustaba el sabor y/o la textura del huevo poco cocinado. La indicación de ofrecer el huevo poco cocinado (huevo frito, tortilla poco cocinada o huevo revuelto) en la fase de mantenimiento pudo influir en esta percepción. Esta circunstancia también fue observada por otro estudio de ITOH que describió que la mayoría de los padres observaron que a sus hijos les resultaba desagradable la ingestión regular de la dosis de alimento en forma de huevo crudo (Vázquez Ortiz y cols., 2014). En línea con estas observaciones, diferentes estudios han descrito que entre el 17% y el 32% de los pacientes con alergia a los alimentos que superan una prueba de exposición oral tienen dificultades para reintroducir el alimento en su dieta (Eigenmann y cols., 2006, Flammarion y cols., 2010, Van Erp y cols., 2014, Van der Valk y cols., 2015). Las razones expresadas por los padres son principalmente la aversión y el rechazo al alimento implicado, y el miedo a sufrir una reacción. Sin embargo, en un reciente estudio retrospectivo de Polloni y cols. (Polloni y cols., 2017), la no reintroducción del alimento en los 6 meses siguientes a una prueba de exposición negativa se estimó en un 11%, cifra significativamente inferior a la de estudios anteriores y que pudo estar favorecida, entre otras causas, por la tutela de un alergólogo y un dietista en la reintroducción del alimento en la dieta de los pacientes. En dicho estudio, se observó además un aumento en el interés de los pacientes por tomar nuevos alimentos y una reducción en la monotonía de sus dietas. Esto demuestra que la intervención de un dietista en la incorporación del alimento en la dieta, y su consejo en la preparación de recetas y productos elaborados con huevo, podría reducir la aversión al alimento y aumentar el interés por el mismo.

El 88,5% (54/61) de los pacientes del presente estudio tuvieron buena adherencia al tratamiento, sin que se produjeran abandonos a largo plazo por esta causa. Esta observación pudo estar motivada probablemente por el seguimiento cercano del alergólogo y por la protección que la ITOH le confería al paciente frente a ingestiones accidentales del alimento.

El análisis del cuestionario de satisfacción tiene varias debilidades. Por un lado, no fue planteado como objetivo inicial del estudio, que se centró en la eficacia y seguridad de la

ITOH, por lo que no se dispuso de una evaluación basal. La evaluación prospectiva en diferentes tiempos del tratamiento hubiese permitido observar cambios en el patrón de respuestas a las preguntas. Además, las preguntas realizadas no siguieron los dominios ni las preguntas de un cuestionario de CVRS estandarizado, como por ejemplo los específicos para alergia a alimentos Food Allergy Quality of life Questionnaires (Flokstra-de Blok y cols., 2009), por lo que sus resultados no han podido ser comparados con los de otros estudios (Vázquez-Ortiz y cols., 2014). Por todo ello, estos datos deben ser interpretados en el contexto del propio estudio.

El análisis de citoquinas en suero no detectó de manera consistente un cambio en el patrón de respuesta de los linfocitos T helper a los 18 meses de ITOH. Se detectaron descensos significativos en los niveles de interleucinas IL-1b, IL-5 e IL-12(p70) a los 12 meses. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo 6 meses después. De la misma forma, la disminución en la relación de citoquinas Th2/Th1 (IL-4+IL-5+IL-6+IL-10+IL-13) / (IFN- γ +IL-2+TNF- α) a los 12 meses no se consolidó a los 18 meses.

Varios ensayos han explorado la evolución de los niveles séricos de diferentes citoquinas durante la ITOH. IL-1b (Fuentes Aparicio y cols., 2012), IL-4 (Itoh y cols., 2010, Fuentes Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012), IL-5 (Fuentes Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012), IL-6 (Meglio y cols., 2012), IL-9 (Fuentes Aparicio y cols., 2012), IL-10 (Itoh y cols., 2010, Fuentes Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012), IL-12 (Fuentes Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012), IL-13 (Fuentes Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012), IL-17A (Fuentes Aparicio y cols., 2012), IL-22 (Fuentes Aparicio y cols., 2012), INF- γ (Itoh y cols., 2010, Fuentes Aparicio y cols., 2012), TNF- α (Fuentes Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012), IFN-c (Meglio y cols., 2012), TGF- α 1 (Itoh y cols., 2010), TGF- β 1 (Itoh y cols., 2010, Meglio y cols., 2012) y TGF- β 2 (Meglio y cols., 2012) han sido objeto de análisis. Los resultados de dichos ensayos han arrojado datos dispares. Cambios como la disminución observada en los niveles de IL-10 a lo largo de la ITOH en dos estudios (Itoh y cols., 2010 y Fuentes-Aparicio y cols., 2012), no han sido detectados para otras citoquinas, con resultados dispares para IL5, con aumentos (Meglio y cols., 2012) o descensos (Fuentes Aparicio y cols., 2012) respectivamente, o sin variaciones significativas en el resto de las citoquinas analizadas (Meglio y cols., 2012). Únicamente Fuentes Aparicio y cols. (Fuentes Aparicio y cols., 2012), observaron al final de la ITOH (12 meses) un marcado descenso de citoquinas Th1

como IL-2, TNF- α , INF- γ , un descenso en citoquinas Th2 como IL-5 e IL-10, y también en otras como IL-9, IL-17A y IL-22 (Fuentes Aparicio y cols., 2012). Sin embargo, estos cambios no han sido reproducidos por otros estudios (Itoh 2010 y cols., Meglio y cols., 2012).

El análisis de la concentración de citoquinas liberadas por las células mononucleares en diferentes las fases de la ITOH podría permitirnos recoger con mayor fidelidad los cambios en la respuesta del sistema inmune, sin verse afectado por la interacción de otras patologías alérgicas intercurrentes ni por la dificultad de cuantificar unas moléculas que se encuentran en muy baja concentración en el torrente circulatorio. Así, Vickery y cols. (Vickery y cols., 2010) observaron una disminución en la ratio de citoquinas Th2/Th1 tras estimular células mononucleares en diferentes fases del tratamiento. Estos datos nos orientan hacia el concepto de que la ITOH impulsa el desarrollo de una respuesta de linfocitos T reguladora. El estudio de las poblaciones de linfocitos T nos aproxima a la realidad íntima de los cambios que se suceden dentro del sistema inmune durante la ITOH. El descenso en el número absoluto de las células T CD4⁺ de memoria efectoras, el aumento de las subpoblaciones de células CD4⁺CD38⁺CD45RO⁻ (Fuentes Aparicio y cols., 2012), el aumento de las células T CD4⁺FoxP3⁺ (Urra y cols., 2012) o el incremento en la ratio de células T reguladoras frente al de células T de memoria efectoras (Fuentes Aparicio y cols., 2014), son un reflejo del camino que la ITOH inicia hacia la tolerancia del alimento.

Los pacientes del presente estudio seleccionados para el análisis de citoquinas reunían las mejores condiciones teóricas para haberse detectado cambios en el patrón de estas, una respuesta favorable a la ITOH y no padecer otras patologías alérgicas. Sin embargo, debe advertirse que una de las limitaciones de esta parte del estudio fue el reducido tamaño de la muestra.

Por lo expuesto anteriormente y al contrario de lo observado para la IgE (Patriarca y cols., 2007, Staden y cols., 2007, Morisset y cols., 2007, Itoh y cols., 2010, Vickery y cols., 2010, García-Rodríguez y cols., 2010, Fuentes-Aparicio y cols., 2012, Meglio y cols., 2012, Dello Iacono y cols., 2013, Burks y cols., 2012, Vila y cols., 2013, Sudo y cols., 2014) y la IgG4 sérica específicas (Patriarca y cols., 2007, Itoh y cols., 2010, Vickery y cols., 2010, Fuentes-Aparicio y cols., 2012, Burks y cols., 2012, Caminiti y cols., 2015), cuyos valores disminuyen y aumentan respectivamente en los respondedores a la ITOH, la medición de citoquinas en suero no resultaría, en consecuencia, útil como marcador para

monitorizar el éxito del tratamiento. Si embargo, debe considerarse que una de las limitaciones del presente estudio de citoquinas fue el reducido tamaño de la muestra.

Por tanto, y más allá del estudio de las poblaciones celulares, alejado aún de la práctica clínica y restringido a los laboratorios de investigación, el seguimiento de la IgE y la IgG₄ séricas, junto a las pruebas cutáneas y la respuesta clínica del paciente, son, por el momento, las herramientas de las que dispone el clínico para monitorizar el éxito o el fracaso de la ITO. Los niveles de IgE a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide al inicio del estudio fueron significativamente menores en los pacientes con TP que en los pacientes desensibilizados a los 3 meses (1,8, 0,8 y 0,6 vs 9,1, 4,2 y 6,4 kU/L, respectivamente), 18 meses (0,8, 0,6 y 0,5 vs 4,4, 2,9 y 0,98 kU/L, respectivamente) y 7 años (0,6, 0,4 y 0,4 vs 2,5, 1,4 y 2 kU/L, respectivamente). Estos resultados son similares a los del otro estudio de seguimiento de ITOH a largo plazo, que, sin ser datos evolutivos, describieron que el porcentaje IgE a huevo con respecto a la IgE total al inicio de la ITOH eran significativamente más bajos en los sujetos que consiguieron una TP ($P = 0,04$) (Jones y cols., 2016). Sin embargo, en dicho estudio el análisis de regresión logística no fue estadísticamente significativo, no detectó diferencias en los niveles de IgE específica entre los pacientes de los grupos de TP y desensibilización, y tampoco pudo identificar predictores de TP como la IgE específica. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas a largo plazo en los niveles de IgG₄ a clara de huevo entre los grupos de TP y desensibilización (4,3 vs 5,1 mg/L, respectivamente), a diferencia del estudio mencionado en el que los pacientes con TP mostraban valores significativamente más altos de IgG₄ específica (Jones y cols., 2016).

Como consecuencia de los resultados obtenidos en los estudios presentados, la CHD analizada ha sido comercializada (OVO-DES y OVO-PRO; Nutrición Médica, Madrid, España) para su uso en la práctica clínica y en el contexto de ensayo clínico, demostrando su utilidad para el diagnóstico y tratamiento de la alergia al huevo. En la actualidad, tanto OVO-DES como OVO-PRO han sido incorporados por diferentes servicios de Alergología de España, Portugal, México, Argentina, Colombia y República Dominicana como fuente alérgica de clara cruda para la realización de pruebas de exposición oral y tratamientos de ITOH.

En resumen, es la primera vez que se demuestra que la alergenicidad de la clara de huevo deshidratada es equivalente a la del huevo crudo. La clara de huevo deshidratada es útil para la prueba de exposición oral en el diagnóstico de alergia al huevo, pues garantiza la alergenicidad de sus proteínas y la seguridad microbiológica. Además, la clara de huevo deshidratada es una fuente de proteína de huevo adecuada para la realización del procedimiento de inmunoterapia oral.

El ensayo clínico muestra que el protocolo presentado de ITOH de corta duración con clara de huevo deshidratada es capaz de inducir una TP a los 3 meses de tratamiento en el 36,7% de los pacientes con alergia persistente al huevo. Además, esta estrategia fue efectiva en el 88,5% de los niños para inducir desensibilización con un riesgo asumible de reacciones adversas. Los niveles de IgE sérica específica a clara de huevo y ovomucoide a lo largo de la inmunoterapia oral con huevo podrían ser marcadores de predicción de TP. Por último, el tratamiento a lo largo plazo continuó mostrándose efectivo en términos de TP, alcanzando este estado el 70,5% de los pacientes estudiados.

7

Conclusiones

1. La clara de huevo deshidratada conserva la alergenicidad de las proteínas de la clara de huevo cruda aportando al mismo tiempo seguridad microbiológica.
2. La clara de huevo deshidratada es recomendable para su uso en la práctica clínica y en el contexto de ensayo clínico, tanto para el diagnóstico de la alergia al huevo mediante la prueba de exposición oral como para el tratamiento de inmunoterapia oral con huevo.
3. El protocolo de inmunoterapia oral con clara de huevo deshidratada fue eficaz para desensibilizar entre el 89 y el 93% de los pacientes en las diferentes fases del ensayo clínico. El 89% de los pacientes que completaron con éxito el tratamiento seguían tomando huevo regularmente hasta 7 años después de haber finalizado la fase de inducción.
4. El protocolo de inmunoterapia oral fue eficaz para inducir tolerancia permanente en el 37% de pacientes a los 4 meses de iniciarse el tratamiento. El 71% de los pacientes llegó a alcanzar este estado a lo largo de los 7 años de seguimiento.
5. El tamaño de las pruebas cutáneas para clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide, y los niveles de IgE sérica específica a ovoalbúmina, disminuyeron de forma significativa a los 4 meses del inicio del tratamiento, lo que demuestra que el procedimiento induce una modulación inmunológica sugestiva de desensibilización.
6. Los pacientes con tolerancia permanente a los 4 meses del inicio de la inmunoterapia oral presentaban niveles de IgE sérica a clara, ovoalbúmina y ovomucoide más bajos que los que no alcanzaron este estado. Un nivel de IgE sérica específica a clara de huevo inferior a 7,1 y a ovomucoide inferior a 1,7 kU/L, predecían la tolerancia permanente con una probabilidad del 67% y 70%, respectivamente. Por tanto, la evolución de los niveles de IgE sérica específica a lo largo del tratamiento podría determinar el momento apropiado para explorar la tolerancia permanente.

7. Se produjeron reacciones adversas hasta en el 6% de las dosis administradas a lo largo de los 3 primeros meses de inmunoterapia oral. El tratamiento fue suspendido en el 8% de los participantes por reacciones adversas recurrentes. El 98% de las reacciones fueron leves, se produjo una sola reacción grave y tres reacciones requirieron el uso de adrenalina intramuscular. Por tanto, el protocolo propuesto podría considerarse como seguro para la población estudiada comparado con estudios previos publicados.
8. Los niveles basales de IgE sérica específica a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide fueron más elevados entre los pacientes que sufrieron reacciones adversas (>8 kU/L) que los de aquellos que toleraron todas las dosis (<5 kU/L). Este parámetro fue un marcador de riesgo de reacción durante la inmunoterapia oral.
9. El subanálisis de citoquinas en suero no reveló de manera consistente un cambio en el patrón de respuesta de los linfocitos T helper durante los 18 primeros meses de tratamiento en pacientes desensibilizados con éxito.
10. El 89% de los pacientes del presente estudio tuvieron una buena adherencia al tratamiento a pesar de que hasta el 59% de ellos refirió disgustarle tomar el alimento. Sin embargo, a los 7 años todos los participantes que completaron con éxito la inmunoterapia oral se mostraron satisfechos con la misma y no hubo ninguno que hubiese preferido no recibirla.

Aplicabilidad y utilidad práctica

- El protocolo de inmunoterapia oral con huevo de corta duración descrito es eficaz y seguro para el tratamiento de la alergia al huevo.
- La clara de huevo deshidratada es una fuente alergénica óptima para el diagnóstico de la alergia al huevo y el tratamiento de inmunoterapia oral, ofrece seguridad microbiológica y permite administrar dosis precisas del alimento.

- Los niveles basales de IgE sérica específica a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide pueden orientar sobre el riesgo de reacciones adversas durante el tratamiento.
- El seguimiento de los niveles de IgE sérica específica a clara de huevo, ovoalbúmina y ovomucoide a lo largo del tratamiento puede facilitar la monitorización del estado de tolerancia permanente.

8

Referencias

- Abrams EM, Singer AG, Lix L, Katz A, Yogendran M, Simons FE. Adherence with epinephrine autoinjector prescriptions in primary care. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2017; 13:46. doi: 10.1186/s13223-017-0218-5.
- Ahrens B, Lopes de Oliveira LC, Schulz G, Borres MP, Niggemann B, Wahn U, Beyer K. The role of hen's egg-specific IgE, IgG and IgG4 in the diagnostic procedure of hen's egg allergy. *Allergy.* 2010;65(12):1554-1557. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02429.x.
- Allen KJ, Remington BC, Baumert JL, Crevel RWR, Houben GF, Brooke-Taylor S, Kruizinga AG, Taylor SL. Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL2.0): clinical implications. *J. Allergy Clin Immunol.* 2014; 133:156-164. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.06.042
- Anagnostou K, Islam S, King Y, Foley L, Pasea L, Bond S, Palmer C, Deighton J, Ewan P, Clark A. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitization of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomized controlled trial. *Lancet.* 2014;383(9925):1297-304. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62301-6.
- Anonymous. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request of the European Commission on a quantitative microbiological assessment on Salmonella in meat. *EFSA J.* 2008;625:5–32.
- Bacal LR. The impact of food allergies on quality of life. *Pediatr Ann.* 2013;42:141-145. doi: 10.3928/00904481-20130619-12.
- Bauer A, Ekanayake Mudiyanse S, Wigger-Alberti W, Elsner P. Oral rush desensitization to milk. *Allergy.* 1999;54: 894-895. PMID: 10485398.
- Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RZ, Sampson HA. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 1047–59. PMID: 8006309.
- Beyer K, Eckermann O, Hompes S, Grabenhenrich L, Worm M. Anaphylaxis in an emergency setting elicitors, therapy and incidence of severe allergic reactions. *Allergy.* 2012;67:1451-1456. doi: 10.1111/all.12012.
- Bianchi DM, Adriano D, Astegiano S, Gallina S, Caramelli M, Decastelli L. Egg and Milk Proteins as Hidden Allergens in Food: 5-Year (2010 to 2014) Results of Food Allergen Monitoring in Piedmont, Italy. *J Food Prot.* 2016;79(9):1583-1587. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-013.

- Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, Knulst AC, Moneret-Vautrin DA, Nekam K, Niggemann B, Osterballe M, Ortolani C, Ring J, Schnopp C, Werfel T. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 2004;59:690-697. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00466.x.
- Björkstén B. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy*. 1994;49:400-407. PMID: 8074261.
- Bollinger ME, Dahlquist LM, Mudd K, Sonntag C, Dillinger L, McKenna K. The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96:415-421. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60908-8.
- Boyano-Martínez T, García-Ara C, Díaz-Pena JM, Martín-Esteban M. Prediction of tolerance on the basis of quantification of egg white-specific IgE antibodies in children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(2):304-309. PMID: 12170273.
- Boyano-Martínez T, Pedrosa M, Quirce S, García-Ara C. Accidental allergic reactions in children allergic to hen's egg. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(2):109-115. PMID: 22533233.
- Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo CA Jr, Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FE, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM. Guidelines for the diagnosis and Management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(Suppl):S1-58. doi: 10.1016/j.jaci.2010.10.007.
- Braden CR. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis*. 2006;43(4):512-517. PMID: 16838242.
- Buchanan AD, Green TD, Jones SM, Scurlock AM, Christie L, Althage KA, Steele PH, Pons L, Helm RM, Lee LA, Burks AW. Egg oral immunotherapy in non-anaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):199-205. doi: 10.1016/j.jaci.2006.09.016.
- Burks AW, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, Fiocchi A, Chiang W, Beyer K, Wood R, Hourihane J, Jones SM, Lack G, Sampson HA. ICON: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):906-920. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.001.

- Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, Stablein D, Henning AK, Vickery BP, Liu AH, Scurlock AM, Shreffler WG, Plaut M, Sampson HA; Consortium of Food Allergy Research (CoFAR). Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med* 2012;367:233-243. doi: 10.1056/NEJMoa1200435.
- Caminiti L, Pajno GB, Crisafulli G, Chiera F, Collura M, Panasci G, Ruggeri P, Guglielmo F, Passalacqua G. Oral Immunotherapy for Egg Allergy: A Double-Blind Placebo-Controlled Study, with Post desensitization Follow-Up. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;47(3):68-76. doi: 10.1016/j.jaip.2015.01.017.
- Caubet JC, Kondo Y, Urisu A, Nowak-Węgrzyn A. Molecular diagnosis of egg allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11(3):210-215. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283464d1b.
- Carraro S, Frigo AC, Perin M, Stefani S, Cardarelli C, Bozzetto S, Baraldi E, Zanconato S. Impact of oral immunotherapy on quality of life in children with cow milk allergy: a pilot study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(3):793-798. doi: 10.1177/039463201202500329.
- Clark AT, Ewan PW. Food allergy in childhood. *Arch Dis Child*. 2004;89(2):197. PMID: PMC1719783.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union.
- Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol*. 1997;159(4):2026-32. PMID: 9257870
- Dello Iacono I, Tripodi S, Calvani M, Panetta V, Verga MC, Miceli Sopo S. Specific oral tolerance induction with raw hen's egg in children with very severe egg allergy: a randomized controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(1):66-74. doi: 10.1111/j.1399-3038.2012.01349.x.
- Diéguez MC, Cerecedo I, Muriel A, Zamora J, Abaira V, Camacho E, Antón M, de la Hoz B. Utility of diagnostic tests in the follow-up of egg-allergic children. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(10):1575-1584. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03299.x.
- De la Hoz Caballero B. (2015). Alergia a los alimentos. En Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y SEFAC (Eds.), *Alergológica 2015* (pp. 206-229). Madrid: Draft Grupo de Comunicación Healthcare.
- Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*. 1983;38(3):167-172. PMID: 6846743.

- Eggesbø M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. *Allergy*. 2001;56(5):403-411. PMID: 11350303.
- Eigenmann P. Anaphilactic reactions to raw eggs after negative challenges with cooked eggs. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(3):587-588. doi: 10.1067/mai.2000.104255.
- Eigenmann PA, Caubet J-C, Zamora SA. Continuing food-avoidance diets after negative food challenges. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(8):601-605. doi: 10.1111/j.1399-3038.2006.00455.x.
- Escudero C, Quirce S, Fernández-Nieto M, de Miguel J, Cuesta J, Sastre J. Egg white proteins as inhalant allergens associated with baker's asthma. *Allergy*. 2003;58(7):616-620. PMID: 12823120.
- Escudero C, García-Fernández C, Ibáñez MD, Arrazola P, de Juanes JR. Reacciones alérgicas a las vacunas. *Vacunas*. 2009;9:156-160.
- European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Position Paper: Immunotherapy. *Allergy*. 1993;48(14 suppl):9-35. PMID: 8342741.
- European Parliament. Regulation (EU) No1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. *Off. J. Eur. Union L* 2011;304:18-63.
- Everberg H, Brostedt P, Oman H, Bohman S, Movérare R. Affinity purification of egg-white allergens for improved component-resolved diagnostics. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011 (1);154:33-41. DOI: 10.1159/000319206.
- Fiocchi A, Schünemann HJ, Brozek J, Restani P, Beyer K, Troncone R, Martelli A, Terracciano L, Bahna SL, Rancé F, Ebisawa M, Heine RG, Assa'ad A, Sampson HA, Verduci E, Bouygue GR, Baena-Cagnani C, Canonica W, Lockey RF. Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1119-1128. doi: 10.1016/j.jaci.2010.10.011.
- Flammarion S, Santos C, Romero D, Thumerelle C, Deschildre A. Changes in diet and life of children with food allergies after a negative food challenge. *Allergy*. 2010;65(6):797-798. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02239.x.
- Flokstra-de Blok BM, DunnGalvin A, Vlieg-Boerstra BJ, Oude Elberink JN, Duiveman EJ, Hourihane JO, Dubois AE. Development and validation of a self-administered Food Allergy Quality of Life Questionnaire for children. *Clin Exp Allergy* 2009;39(1):127-137. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03120.x.

- Fuentes-Aparicio V, Alonso-Lebrero E, Zapatero L, Infante S, Lorente R, Muñoz-Fernández MA, Correa-Rocha R. Oral immunotherapy in hen's egg-allergic children increases a hypo-proliferative subset of CD4+ T cells that could constitute a marker of tolerance achievement. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23(7):648-53. doi: 10.1111/j.1399-3038.2012.01333.x.
- Fuentes-Aparicio V, Elena Alonso-Lebrero E, Zapatero L, Infante S, Lorente R, Muñoz-Fernández MA, Correa-Rocha R. Induction of Treg cells after oral immunotherapy in hen's egg-allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(1):103-106. doi: 10.1111/pai.12137.
- Fuentes-Aparicio V, Álvarez-Perea A, Infante S, Zapatero L, D'Oleo A, Alonso-Lebrero E. Specific oral tolerance induction in paediatric patients with persistent egg allergy. *Allergol Immunopathol*. 2013;41:143-150. doi: 10.1016/j.aller.2012.02.007.
- Fung I, Spergel JM. Administration of influenza vaccine to pediatric patients with egg-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1157-1159. doi: 10.1016/j.jaci.2011.11.038.
- Furuya K, Nagao M, Sato Y, Ito S, Fujisawa T. Predictive values of egg-specific IgE by two commonly used assay systems for the diagnosis of egg allergy in young children: a prospective multicenter study. *Allergy*. 2016;71(10):1435-1443. doi: 10.1111/all.12912.
- García Figueroa B, Díaz Perales A, Rodríguez García R, Garriga Baraut T, Fernández Rivas M (2015). Alérgenos alimentarios. En Dávila I, Jáuregui I, Olaguibel JM, Zubeldia JM (Eds.), *Tratado de Alergología 2ª Edición Tomo III* (pp. 969-989). Madrid: Ergon.
- García-Rodríguez R, Urra JM, Feo-Brito F, Galindo PA, Borja J, Gómez E, Lara P, Guerra F. Oral rush desensitization to egg: efficacy and safety. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(9):1289-1296. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03722.x.
- Guard-Petter J. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. *Environ Microbiol* 2001; 3: 421–30. PMID: 11553232.
- Gorelik M, Narisety SD, Guerriero KL, Keet CA, Bieneman AP, Hamilton RG, Wood RA, Schroeder JT, Frischmeyer-Guerrero PA. Suppression of the immunologic response to peanut during immunotherapy is often transient. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1283-1292. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.010.
- Hirose J, Kitabatake N, Kimura A, Narita H. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68(12):2490-2497. doi: 10.1271/bbb.68.2490.
- Hoffman DR. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J Allergy Clin Immunol*. 1983(5);71:481-486. PMID: 6601671.

- Hofmann AM, Scurlock AM, Jones SM, Palmer KP, Lokhnygina Y, Steele PH, Kamilaris J, Burks AW. Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):286-291. doi: 10.1016/j.jaci.2009.03.045.
- Holen E, Elsayed S. Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-Immunoautoradiography. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;91:136-141. PMID: 1692814.
- Ibáñez MD. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos (Artículo especial). *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*. 1999;14:50-62.
- Ibáñez MD, Garde JM. Allergy in patients under fourteen years of age in *Alergológica* 2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:61-68. PMID:19530421.
- Ibáñez MD, Escudero C, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P. Comprehensive Review of Current Knowledge on Egg Oral Immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015;25(5):316-328. PMID: 26727760.
- Instituto de Estudios del Huevo. (2004). Elaboración y comercialización de los ovoproductos En Instituto de Estudios del Huevo (Ed.), *Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos* (pp 29-41). Madrid: Artes Gráficas G3.
- Instituto de Estudios del Huevo. (2009). Modelo Europeo de Producción de huevos y ovoproductos. En Instituto de Estudios del Huevo (Ed.), *El Gran Libro del Huevo* (pp 10-20). León: Editorial Everest.
- Itoh N, Itagaki Y, Kurihara K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergol Int*. 2010;59(1):43-51. doi: 10.2332/allergolint.09-OA-0107.
- Jansson SE, Heibert-Arnlin M, Middelveld R, Bengtsson UJ, Sundqvist AC, Kallström-Bengtsson I, Marklund B, Rentzos G, Åkerström J, Östblom E, Dahlén SE, Ahlstedt S. Health-related quality of life, assessed with a disease-specific questionnaire, in Swedish adults suffering from well-diagnosed food allergy to staple foods. *Clin Transl Allergy*. 2013;3:21. doi: 10.1186/2045-7022-3-21.
- Järvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy*. 2007;62(7):758-765. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01332.x.
- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wuthrich B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56:813-824. PMID: 11551246.

- Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):832-836. PMID: 15131563.
- Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, Shreffler WG, Steele P, Henry KA, Adair M, Francis JM, Durham S, Vickery BP, Zhong X, Burks AW. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):292-300. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.022.
- Jones SM, Burks AW, Keet CA, Vickery BP, Scurlock AM, Wood RA, MD, Liu AH, Sicherer SH, Henning AK, MS, Lindblad RW, Dawson P, Berin C, Fleischer DM, Leung DYM, Plaut M, Sampson HA. Consortium of Food Allergy Research (CoFAR). Long-term treatment with egg oral immunotherapy enhances sustained unresponsiveness that persists after cessation of therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:1117-1127. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.022.
- Jones SM, Sicherer SH, Burks AW, Leung DY, Lindblad RW, Dawson P, Henning AK, Berin MC, Chiang D, Vickery BP, Pesek RD, Cho CB, Davidson WF, Plaut M, Sampson HA, Wood RA; Consortium of Food Allergy Research. Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1242-1252. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.017.
- Jurado-Palomo J, Fiandor-Román AM, Bobolea ID, Sánchez-Pastor S, Pascual CY, Quirce S. Oral Challenge with Pasteurized Egg White from *Gallus domesticus*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(4):331-335. doi: 10.1159/000250441.
- Keet CA, Seopaul S, Knorr S, Narisety S, Skripak J, Wood RA. Long-term follow-up of oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):737-739. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.006.
- Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J. Avon Longitudinal Study of parents and children study team. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med*. 2003;348(11):977-985. doi: 10.1056/NEJMoa013536.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. PMID: 5432063.
- Langeland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. VI. Occurrence of proteins cross-reacting with allergens in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh. *Allergy*. 1983;38(6):399-412. PMID: 6625124.
- Leonard SA, Sampson HA, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Goldbold J, Nowak-Węgrzyn A. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):473-480. doi: 10.1016/j.jaci.2012.06.006.

- Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, Burks AW, Schneider LC, Wortel CH, Davis FM, Hyun JD, Shanahan WR Jr. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med*. 2003;348(11):986-993. doi: 10.1056/NEJMoa022613.
- Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L, Ventura A. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):343-347. doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.029.
- Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(6):624-629. doi: 10.1016/j.anai.2014.08.004.
- Martorell A, Pérez C, Cerdá JC, Ferriols E, Alvarez V. Inducción de tolerancia clínica en alérgicos a leche de vaca. *Allergol Immunopathol*. 2002; 10: 183.
- Martorell A, Alonso E, Boné J, Echevarría L, López MC, Martín F, Nevot S, Plaza AM; Food Allergy Committee of SEICAP. Food allergy: Committee of SEICAP. Position document: IgE-mediated allergy to egg protein. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;41:320-336. doi: 10.1016/j.aller.2013.03.005.
- Martorell A, Alonso E, Echeverría L, Escudero C, García-Rodríguez R, Blasco C, Boné J, Borja-Segade J, Bracamonte T, Claver A, Corzo JL, De la Hoz B, Del Olmo R, Domínguez O, Fuentes-Aparicio V, Guallar I, Larramona H, Martín-Muñoz F, Matheu V, Michavila A, Ojeda I, Ojeda P, Piquer M, Poza P, Reche M, Rodríguez del Río P, Rodríguez M, Ruano F, Sánchez-García S, Terrados S, Valdesoiro L, Vázquez-Ortiz M. Oral immunotherapy for food allergy: a spanish guideline. Egg and Milk Immunotherapy Spanish Guide (items guide). Part I. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(4):225-237. doi: 10.18176/jiaci.0177.
- Martorell A, Alonso E, Echeverría L, Escudero C, García-Rodríguez R, Blasco C, Boné J, Borja-Segade J, Bracamonte T, Claver A, Corzo JL, De la Hoz B, Del Olmo R, Domínguez O, Fuentes-Aparicio V, Guallar I, Larramona H, Martín-Muñoz F, Matheu V, Michavila A, Ojeda I, Ojeda P, Piquer M, Poza P, Reche M, Rodríguez del Río P, Rodríguez M, Ruano F, Sánchez-García S, Terrados S, Valdesoiro L, Vázquez-Ortiz M. Oral immunotherapy for food allergy: a spanish guideline. Egg and Milk Immunotherapy Spanish Guide (items guide). Part II. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(5):279-290. doi: 10.18176/jiaci.0178.
- Matsuoka DM, Costa SF, Mangini C, Almeida GM, Bento CN, Van Der Heijden IM, Soares RE, Gobara S, Távora LG, Levin AS. A nosocomial outbreak of Salmonella enteritidis associated with lyophilized enteral nutrition. *J Hosp Infect* 2004; 58: 122–7. doi: 10.1016/j.jhin.2004.05.003.
- Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*. 2004;59:980-987. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00542.x.

- Meglio P, Giampietro PG, Carello R, Gabriele I, Avitabile S, Galli E. Oral food desensitization in children with IgE-mediated hen's egg allergy: a new protocol with raw hen's egg. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013;24:75-83. doi: 10.1111/j.1399-3038.2012.01341.x.
- Mine Y, Zhang JW. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *J Agric Food Chem.* 2002;50(9):2679-2683. PMID: 11958641.
- Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *J Agr Food Chem.* 2008;56(13):4874-4900. PMID: 11958641.
- Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, Cuny JM, Frentz P, Hatahet R, Hanss Ch, Beaudouin E, Petit N, Kanny G. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2007;39(1):12-19. PMID: 17375736.
- Motosue MS, Bellolio MF, Van Houten HK, Shah ND, Campbell RL. National trends in emergency department visits and hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2018 Apr 17. doi: 10.1111/pai.12908.
- Martín-Muñoz F, Elena Alonso E, Zapatero L, Fuentes-Aparicio V, Piquer M, Plaza-Martín AM, Muñoz C, Belver MT, Martorell-Calatayud C, Martorell A, Blasco C, Vilá B, Gómez C, Nevot S, García-Martín JM, Madero R, Echeverría L. Egg OIT in clinical practice (SEICAP II): Maintenance patterns and desensitization state after normalizing the diet. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019;30:214–224. doi: 10.1111/pai.13002.
- Muñoz-Cano R, Sánchez-López J, Bartra J, Valero A. Yellow fever vaccine and egg allergy: really problem? *Allergy.* 2010;65(4):533-534. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02205.x
- Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Gorelik M, Schroeder J, Hamilton RG, Wood RA. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Sublingual versus Oral Immunotherapy for the Treatment of Peanut Allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(5):1275-1282. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.005.
- Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99:744-751. PMID: 9215240.
- Nickel R, Kulig M, Forster J, Bergmann R, Bauer CP, Lau S, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U. Sensitization to hen's egg at the age of twelve months is predictive for allergic sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(5):613-617. PMID: 9155826.

- Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock S, Sicherer SH, Teuber SS. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:S365-383. doi: 10.1016/j.jaci.2009.03.042.
- Nowak-Wegrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1114-24. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.025.
- Nucera E, Schiavino D, D'Ambrosio C, Stabile A, Rumi C, Gasbarrini G, Patriarca G. Immunological aspects of oral desensitization in food allergy. *Dig Dis Sci*. 2000;45:637-641. PMID: 10749345.
- Nurmatov U, Dhami S, Arasi S, Pajno GB, Fernández-Rivas M, Muraro A, Roberts G, Akdis C, Alvaro-Lozano M, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Burks AW, du Toit G, Ebisawa M, Eigenmann P, Knol E, Makela M, Nadeau KC, O'Mahony L, Papadopoulos N, Poulsen LK, Sackesen C, Sampson HA, Santos AF, van Ree R, Timmermans F, Sheikh A. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017;72(8):1133-1147. doi: 10.1111/all.13124.
- Ojeda P, Ojeda I, Rubio G, Pineda F. Home-based oral immunotherapy protocol with pasteurized egg for children allergic to hen's egg. *Isr Med Assoc J*. 2012;14(1):34-39. PMID: 22624440.
- Osborne NJ, Koplin JJ, Martín PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC, Ponsonby AL, Wake M, Tang ML, Dharmage SC, Allen KJ; HealthNuts Investigators. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):668-676. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.039.
- Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Host A, Bindslev-Jensen C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16(7):567-573. doi: 10.1111/j.1399-3038.2005.00251.x.
- Otani IM, Bégin P, Kearney C, Domínguez TL, Mehrotra A, Bacal LR, Wilson S, Nadeau K. Multiple-allergen oral immunotherapy improves quality of life in caregivers of food-allergic pediatric subjects. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):25. doi: 10.1186/1710-1492-10-25.
- Pajno GB, Fernández-Rivas M, Arasi S, Roberts G, Akdis CA, Alvaro-Lozano M, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Burks W, Ebisawa M, Eigenmann P, Knol E, Nadeau KC, Poulsen LK, van Ree R, Santos AF, du Toit G, Dhami S, Nurmatov U, Boloh Y, Makela M, O'Mahony L, Papadopoulos N, Sackesen C, Agache I, Angier E, Halken S, Jutel M, Lau S, Pfaar O, Ryan D, Sturm G, Varga EM, van Wijk RG, Sheikh A, Muraro A; EAACI Allergen Immunotherapy Guidelines Group. EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy. *Allergy*. 2018;73(4):799-815. doi: 10.1111/all.13319.

- Patriarca C, Romano A, Venuti A, Schiavino D, Di Rienzo V, Nucera E, Pellegrino S. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1984;12(4):275-281. PMID: 6507224.
- Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A, Gasbarrini GB. Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization. *Hepatogastroenterology*. 1998;45:52-58. PMID: 9496487.
- Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, Bartolozzi F, De Pasquale T, Buonomo A, Gasbarrini G, Di Campli C, Schiavino D. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:459-465. PMID: 12562461.
- Patriarca G, Nucera E, Pollastrini E, Roncallo C, De Pasquale T, Lombardo C, Pedone C, Gasbarrini G, Buonomo A, Schiavino D. Oral specific desensitization in food-allergic children. *Dig Dis Sci*. 2007;52(7):1662-1672. doi: 10.1007/s10620-006-9245-7.
- Peters RL, Dharmage SC, Gurrin LC, Koplin JJ, Ponsonby AL, Lowe AJ, Tang ML, Tey D, Robinson M, Hill D, Czech H, Thiele L, Osborne NJ, Allen KJ; HealthNuts study. The natural history and clinical predictors of egg allergy, in the first 2 years of life: a prospective, population-based cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;133(2):485-491. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.032.
- Pérez-Rangel I, Rodríguez del Río P, Escudero C, Sánchez-García S, Sánchez-Hernández JJ, Ibáñez MD. Efficacy and safety of high-dose rush oral immunotherapy in persistent egg allergic children: A randomized clinical trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118(3):356-364. doi: 10.1016/j.anai.2016.11.023.
- Piquer-Gibert M, Plaza-Martín A, Martorell-Aragonés A, Ferré-Ybarz L, Echeverría-Zudaire L, Boné-Calvo J, Nevot-Falcó S; Food Allergy Committee of the Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica. Recommendations for administering the triple viral vaccine and antiinfluenza vaccine in patients with egg allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007;35:209-12. PMID: 17923075.
- Polloni L, Ferruzza E, Ronconi L, Toniolo A, Lazzarotto F, Bonaguro R, Celegato N, Muraro A. Assessment of children's nutritional attitudes before oral food challenges to identify patients at risk of food reintroduction failure: a prospective study. *Allergy*. 2017;72(5):731-736. doi: 10.1111/all.13055.
- Prescott SL, Allen KJ. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(2):155-160. doi: 10.1111/j.1399-3038.2011.01145.x.
- Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Campbell DE, Sinn JKh, Fiocchi A, Ebisawa M, Sampson HA, Beyer K, Lee BW. A Global Survey of changing patterns of food allergy burden in children. *WAO J*. 2013;6(1):21. doi: 10.1186/1939-4551-6-21.

- Quirce S, Marañón F, Umpiérrez A, de las Heras M, Fernández-Caldas E, Sastre J. Chicken serum albumin (Gal d 5*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy*. 2001;56(8):754-62. PMID: 11488669.
- Ricci G, Patrizi A, Baldi E, Menna G, Tabanelli M, Masi M. Long-term follow-up of atopic dermatitis: retrospective analysis of related risk factors and association with concomitant allergic diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(5):765-771. doi: 10.1016/j.jaad.2006.04.064.
- Ridolo E, De Angelis GL, Dall'aglio P. Eosinophilic esophagitis after specific oral tolerance induction for egg protein. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106(1):73-74. doi: 10.1016/j.anai.2010.10.010.
- Ruiz García M, Haroun E, Landívar ME, Torres Hernandez JA, Sastre J. Commercial dehydrated egg white for specific oral tolerance induction (SOTI): an easier treatment for egg allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(7):529-531. PMID: 23397680.
- Sackeyfio A, Senthinathan A, Kandaswamy P, Barry PV, Shaw B, Baker M. Diagnosis and assessment of food allergy in children and young people: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2011;342(23):d747. doi: 10.1136/bmj.d747.
- Samady W, Trainor J, Smith B, Gupta R. Food-induced Anaphylaxis in Infants and Children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018 May 31. pii: S1081-1206(18)30391-0. doi: 10.1016/j.anai.2018.05.025. [Epub ahead of print].
- Sampson H. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107:891–896. doi: 10.1067/mai.2001.114708.
- Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S540-547. PMID: 12592300.
- Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, Sicherer S, Teuber SS, Burks AW, Dubois AE, Beyer K, Eigenmann PA, Spergel JM, Werfel T, Chinchilli VM. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology–European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1260–1274. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.017.
- Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Escudero C, Martínez-Gómez MJ, Ibáñez MD. Possible eosinophilic esophagitis induced by milk oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1155-7. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.11.042.
- Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood RA. The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:1413-147. doi: 10.1016/j.jaci.2007.09.040.

- Schenieder JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttorp MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ, Shekelle PG. Diagnosing and managing common food allergies. A systematic review. *JAMA*. 2010;303(18):1848-1856. doi: 10.1001/jama.2010.582.
- Skripak JM1, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, Wood RA.. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:1154–1160. doi: 10.1016/j.jaci.2008.09.030.
- Sicherer SH, Wood RA, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM, Dawson P, Mayer L, Burks WA, Grishin A, Stablein D, Sampson HA. The natural history of egg allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:492-499. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1041.
- Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):291-307. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.020.
- Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. (1995). Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España. En Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (Ed.), *Alergológica 1995*. Madrid: Nilo Industria Gráfica.
- Srivastava KD, Kattan JD, Zou ZM, Li JH, Zhang L, Wallenstein S, Goldfarb J, Sampson HA, Li XM. The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):171-178. doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.003.
- Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy*. 2007;62(11):1261-1269. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01501.x.
- Stensgaard A, Bindslev-Jensen C, Nielsen D, Munch M, Dunngalvin A. Quality of life in childhood, adolescence and adult food allergy: Patient and parent perspectives. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(4):530-539. doi: 10.1111/cea.12849.
- Sudo K, Taniuchi S, Takahashi M, Soejima K, Hatano Y, Nakano K, Shimo T, Koshino H, Kaneko K. Home-based oral immunotherapy (OIT) with an intermittent loading protocol in children unlikely to outgrow egg allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2014;10(1):11. doi: 10.1186/1710-1492-10-11.
- Syed A, García MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, Berglund JP, Tsai M, Maecker H, O'Riordan G, Galli SJ, Nadeau KC. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):500-510. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1037.

- Tang ML, Ponsonby AL, Orsini F, Tey D, Robinson M, Su EL, Licciardi P, Burks AW, Donath S. Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: A randomized trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(3):737-744. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.034.
- Tomicić S, Norrman G, Fälth-Magnusson K, Jenmalm MC, Devenney I, Böttcher MF. High levels of IgG4 antibodies to foods during infancy are associated with tolerance to corresponding foods later in life. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(1):35-41. doi: 10.1111/j.1399-3038.2008.00738.x.
- Tortajada-Girbés M, Porcar-Almela M, Martorell-Giménez L, Tallón-Guerola M, Gracia Antequera M, Codoñer-Franch P. Specific Oral Tolerance Induction (SOTI) to Egg: Our Experience With 19 Children. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(1):63-79. PMID: 22448463.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(9):4350-4354. PMID: 388439.
- Umasunthar T, Leonardi-Bee J, Turner PJ, Hodes M, Gore C, Warner JO. Incidence of food anaphylaxis in people with food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(11):1621-1636. doi: 10.1111/cea.12477.
- Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, Komada K, Torii S, Goto M, Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(2):171-176. PMID: 9275136.
- Urisu A, Yamada K, Tokuda R, Ando H, Wada E, Kondo Y, Morita Y. Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;120(3):192-198. DOI: 10.1159/000024267.
- Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama T, Orikawa A, Kondo N. Japanese guideline for food allergy. *Allergol Int.* 2011;60(2):221-236. doi: 10.2332/allergolint.11-RAI-0329.
- Urrea JM, García Rodríguez R, Feo Brito F, Mur P, Guerra F. Oral Desensitization to Egg Enables CD4+FoxP3+ Cells to Expand in Egg-Stimulated Cells. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(1):71-73. PMID: 22448461.
- Van der Valk JPM, van Wijk RG, Vergouwe Y, de Jong NW. Failure of introduction of food allergens after negative oral food challenge tests in children. *Eur J Pediatr.* 2015;174(8):1093-1099. doi: 10.1007/s00431-015-2504-x.
- Van der Velde JL, Flokstra-de Blok BM, Dunngalvin A, Hourihane JO, Duiverman EJ, Dubois AE. Parents report better health-related quality of life for their food-allergic children than children themselves. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(10):1431-9. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03753.x.

- Van Erp FC, Boot J, Knulst AC, Pasmans SG, van der Ent CK, Meijer Y. Reintroduction failure after negative peanut challenges in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(6):580-585. doi: 10.1111/pai.12266.
- Vázquez-Ortiz M, Álvaro M, Piquer M, Domínguez O, Machinena A, Martín-Mateos MA, Plaza AM. Baseline specific IgE levels are useful to predict safety of oral immunotherapy in egg-allergic children. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(1):130-141. doi: 10.1111/cea.12233.
- Vázquez-Ortiz M, Álvaro M, Piquer M, Domínguez O, Giner MT, Lozano J, Jiménez-Feijoo R, Plaza AM. Impact of oral immunotherapy on quality of life in egg-allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2015;26(3):291-294. doi: 10.1111/pai.12355.
- Vázquez-Ortiz M, Turner PJ. Improving the safety of oral immunotherapy for food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(2):117-125. doi: 10.1111/pai.12510.
- Vickery BP, Pons L, Kulis M, Steele P, Jones SM, Burks AW. Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105(6):444-450. doi: 10.1016/j.anai.2010.09.030.
- Vickery BP, Lin J, Kulis M, Fu Z, Steele PH, Jones SM, Scurlock AM, Giménez G, Bardina L, Sampson HA, Burks AW. Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):128-134. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.048.
- Vickery BP, Scurlock AM, Kulis M, Steele PH, Kamilaris J, Berglund JP, Burk C, Hiegel A, Carlisle S, Christie L, Perry TT, Pesek RD, Sheikh S, Virkud Y, Smith PB, Shamji MH, Durham SR, Jones SM, Burks AW. Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):468-475. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.007.
- Vila L, Moreno A, Gamboa PM, Martínez-Aranguren R, Sanz ML. Decrease in antigen-specific CD63 basophil expression is associated with the development of tolerance to egg by SOTI in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(5):463-468. doi: 10.1111/pai.12070.
- Vonk MM, Wagenaar, Pieters RHH, Knippels LMJ, Willemsen LEM, Smit JJ, van Esch BCAM, Garssen J. The efficacy of oral and subcutaneous antigen-specific immunotherapy in murine cow's milk and peanut allergy models. *Clin Transl Allergy*. 2017;7:35. doi: 10.1186/s13601-017-0170-y.
- Wood RA, Sicherer SH, Burks AW, Grishin A, Henning AK, Lindblad R, Stablein D, Sampson HA. A phase 1 study of heat/phenol-killed, *E. coli*-encapsulated, recombinant modified peanut proteins Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3 (EMP-123) for the treatment of peanut allergy. *Allergy*. 2013;68(6):803-808. doi: 10.1111/all.12158.

- Wood RA, Kim JS, Lindblad R, Nadeau K, Henning AK, Dawson P, Plaut M, Sampson HA. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of omalizumab combined with oral immunotherapy for the treatment of cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1103-1110. doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.005.
- Worm M, Francuzik W, Renaudin JM, BAIlo MB, Cardona V, Scherer Hofmeier k, Köhli A, Bauer A, Cristoff G, Cicohocka-jarosz E, Hawranek T, Hourihane J, Lange L, Mahler V, Muraro A, Papadopoulos NG, Pföhler C, Poziomkowska-Gesicka I, ruëff, Spindler T, Treudler r, Fernández-Rivas M, Döhle S. Factors increasing the risk for a severe reaction in anaphylaxis: An analysis of data from The European Anaphylaxis Registry. *Allergy*. 2018;73(6):1322-1330.

9

Anexos

9.1. Anexo I: Consentimientos informados

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO A LOS PADRES DEL PACIENTE O A SU REPRESENTANTE LEGAL

TÍTULO DEL PROYECTO: Inducción de tolerancia oral a huevo en pacientes con alergia mediada por anticuerpos IgE

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carmelo Escudero Díez

Introducción y objetivos

Su hijo/a ha sido diagnosticado/a de alergia a las proteínas de huevo. Este tipo de alergia es transitoria en la mayoría de los casos, alcanzando la tolerancia en los primeros años de vida. Sin embargo, en algunos casos persiste y permanece durante años, con el riesgo de reacción, que puede llegar a ser grave tras la ingestión accidental de alimentos o bebidas que contengan proteínas de huevo. Esta situación obliga a revisar cuidadosamente la composición de los alimentos que toma el/la niño/a.

Existe la posibilidad de adelantar la tolerancia mediante una pauta de inducción de tolerancia, que consiste en dar pequeñas cantidades de clara de huevo en polvo. La cantidad de huevo que recibe el paciente aumenta progresivamente cada día hasta alcanzar una cantidad equivalente a una clara de huevo deshidratada. Este tratamiento ha sido utilizado en estudios realizados en otros países obteniéndose buenos resultados.

El objetivo del presente estudio es poder inducir la tolerancia a huevo de manera segura y rápida en pacientes alérgicos a proteínas de huevo.

Debe leer cuidadosamente estas hojas de información y preguntar al médico cualquier duda que pueda tener. La participación de su hijo/a en el estudio es totalmente voluntaria.

Realización del estudio

En el estudio participarán aproximadamente 60 pacientes/as, y cada paciente permanecerá en el estudio durante 4 meses, pudiendo salir del mismo en cualquier momento, sin sufrir por ello menoscabo alguno en la calidad de su asistencia.

Con el fin de comprobar la eficacia del tratamiento, un grupo de pacientes recibirán el tratamiento de inducción de tolerancia y otro grupo simplemente continuarán realizando la dieta de eliminación de huevo. La asignación a uno u otro grupo se realizará al azar (como si fuera a cara y cruz al lanzar una moneda al aire). Si a su hijo le corresponde el grupo que va a continuar con la dieta de eliminación de huevo, transcurridos los 4 meses del estudio y si persiste la alergia a las proteínas de huevo, podrá iniciar el tratamiento de inducción de tolerancia si los resultados del estudio han sido favorables.

Si a su hijo/a le corresponde entrar en el grupo de tratamiento, el estudio se compone de un mínimo de 11 y un máximo de 15 visitas a lo largo de 4 meses. En las 10 visitas semanales programadas para administrar el tratamiento se realizará una exploración clínica básica y se le administrará la dosis correspondiente de clara de huevo en polvo indicada en

el protocolo, hasta comprobar la tolerancia. El paciente deberá permanecer bajo supervisión médica del alergólogo en nuestra sección durante una hora.

En la primera visita y en las visitas de revisión a los 3 y 4 meses se le realizarán pruebas cutáneas a huevo y fracciones (clara, yema, ovoalbúmina, ovomucoide y lisozima) mediante técnica de prick- test (las típicas “pruebas de la alergia”) y se le hará una extracción de sangre. Esto es lo que se hace habitualmente en las revisiones anuales a los pacientes con alergia a proteínas de huevo para valorar su grado de alergia.

A los 3 meses del inicio del tratamiento, se le indicará al paciente que retire el huevo de la dieta durante un mes. Trascurrido este mes, acudirá de nuevo a nuestra sección para confirmar la tolerancia del alimento mediante una prueba de exposición. Si se produce una reacción alérgica durante esta exposición, deberá reanudar la pauta de inducción a partir de la última dosis tolerada durante la prueba. En esta visita (4 meses de el inicio del tratamiento), se le realizarán pruebas cutáneas a huevo y fracciones mediante técnica de prick-test y se le hará una extracción de sangre.

Se le pedirá que apunte en un diario la dosis de clara de huevo en polvo que toma cada día y si se ha producido alguna reacción.

Si a su hijo/a le corresponde el grupo que no va a recibir el tratamiento, continuará con la dieta sin huevo durante 4 meses. En la primera visita y en la visita de revisión a los 4 meses se le realizarán pruebas cutáneas a huevo y fracciones, se le hará una extracción de sangre y una prueba de exposición a la clara de huevo para comprobar si ya tolera el alimento.

El volumen de sangre por extracción será de 5 cc si su hijo tiene entre 5 y 7 años, de 7 cc si su hijo tiene entre 8 y 11 años y de 10 cc si es mayor de 11 años. El suero obtenido de la muestra de sangre será utilizado para realizar las habituales determinaciones de anticuerpos específicos frente a proteínas de huevo. Además, una parte del suero obtenido será utilizado para analizar los posibles cambios inmunológicos que se produzcan durante el tratamiento, si le corresponde el grupo de tratamiento, o durante la dieta sin huevo, si le corresponde el grupo que no va a recibir el tratamiento. Se seguirá en todo momento la Ley de Investigación Biomédica respecto a las muestras humanas del 3 de Julio de 2007.

La prueba de exposición para comprobar la tolerancia al huevo se realizará mediante la técnica denominada “doble ciego” que consiste en administrar un día clara de huevo enmascarada en zumo de piña y otro día se cambia el huevo por leche de soja en polvo, sin que lo conozca el niño/a, los padres ni el médico con el fin de evitar la influencia de la sensación de reacción por las experiencias previas.

Efectos no deseados (Riesgos del estudio)

Las pruebas cutáneas se realizan en el antebrazo. Son las pruebas que se realizan en la Consulta de Alergia, y se hacen habitualmente para poder diagnosticar a su hijo/a de alergia a proteínas de huevo. La posibilidad de efectos adversos es excepcional (infección del punto de prick, reacción tardía inflamatoria) y más excepcionalmente posibilidad de síntomas sistémicos al realizarla en caso de extrema sensibilización, como urticaria, clínica de dificultad respiratoria, shock, etc.

La extracción de sangre, de aproximadamente 10 ml puede ocasionar una pequeña incomodidad en el brazo y hematoma.

La prueba de exposición y la pauta de inducción de tolerancia a dosis progresivas puede producir una reacción alérgica al llegar a una determinada cantidad de clara de huevo

en polvo, que puede llegar a ser grave (urticaria, hinchazón de labios y párpados, congestión nasal y ocular, espasmo bronquial, vómitos, diarrea, dificultad respiratoria por hinchazón de las vías respiratorias, caída de la tensión arterial, shock, etc.) y que se trataría inmediatamente con la medicación correspondiente y adecuada a su edad y peso.

La reacción es la misma que se produciría si por accidente le dieran a tomar al niño/a una cantidad equivalente de huevo en el colegio o en una excursión fuera del domicilio, con la diferencia de que en el Hospital contamos con los medios necesarios para tratarla y controlarla inmediatamente.

Otros riesgos o complicaciones que podrían aparecer, dada su situación clínica y sus circunstancias personales, son.....

Criterios de alerta en casa

Si en cualquier momento del estudio su hijo/a presenta síntomas de reacción alérgica (urticaria, hinchazón de labios y párpados, congestión nasal y ocular, espasmo bronquial, vómitos, diarrea, dificultad respiratoria por hinchazón de las vías respiratorias, etc.) además de darle la medicación que su médico le habrá recomendado y de llevarlo a un centro sanitario, usted puede y debe telefonar en cualquier momento del día al médico del estudio para regresar a la consulta antes de la fecha programada.

Retirada del estudio

Los pacientes y los progenitores o tutores legales tienen derecho a abandonar el estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. En cualquier momento su médico puede decidir finalizar el estudio o retirar a su hijo/a por motivos de seguridad. Los datos obtenidos de la participación de su hijo/a en el estudio no serán incluidos en el análisis final de los resultados.

Tratamientos alternativos

En cualquier momento Ud. puede decidir libremente que no participe su hijo/a. Su médico le informará de la dieta de eliminación de proteínas de huevo y le recomendará un tratamiento para aplicar en caso de ingestión accidental del alimento mientras acude a un centro sanitario.

Su hijo/a seguirá sus revisiones habituales en la Consulta de Alergia sin que ello suponga un menoscabo en la atención del paciente con respecto a otros pacientes y sin que afecte a su tratamiento actual o futuro por su médico.

Beneficios para su hijo/a

No se pueden garantizar beneficios por la participación de su hijo/a en el estudio, aunque de los resultados que se extraigan del mismo se pueden favorecer a futuros pacientes.

Aspectos éticos y legales del estudio

El diseño de este estudio ha sido evaluado y aprobado por un Comité Ético independiente y se realizará de acuerdo con las normativas legales nacionales.

Si usted decide que su hijo/a participe en este estudio, deberá firmar este consentimiento, en el que se establece que está de acuerdo voluntariamente en participar y que ha leído y entendido la información proporcionada.

Verificación de datos

Los representantes de las autoridades sanitarias podrán revisar los datos médicos importantes de la historia clínica de su hijo/a para confirmar la precisión de los datos recogidos durante el estudio.

La identidad y los datos del participante son absolutamente confidenciales. Sólo su número de participación le identificarán en los registros relacionados con el estudio para poder utilizar los datos, cumpliendo la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal

En caso de emergencia o si necesitara asistencia, consejo u otra información, por favor contacte con:

Dr. Carmelo Escudero Díez

Tfno.: **91 503 59 35 / 606 46 21 91**

- He leído la hoja de información que se me ha entregado: SÍ / NO
- He podido hacer preguntas sobre el estudio: SÍ / NO
- He recibido suficiente información sobre el estudio: SÍ / NO

He hablado con el Dr. Carmelo Escudero Díez

- Comprendo que la participación de mi hijo/a es voluntaria: SÍ / NO
- Comprendo que se puede retirar del estudio cuando quiera y que tengo derecho a revocar el consentimiento de información de datos personales, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos: SÍ / NO

Y presto libremente mi conformidad para que mi hijo/a (nombre del participante)

participe en el estudio *Inducción oral de tolerancia a huevo en pacientes con alergia mediada por anticuerpos IgE* de la Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid.

- Datos del representante legal en caso de minoría de edad del paciente, con indicación del carácter con que interviene (padre, madre, tutor, etc.)

Fdo.:

Fdo.:

Nombre:.....

Médico que informa:

.....

Dr. Carmelo Escudero Díez

DNI:.....

Nº Col.: 282852900.

Lugar y fecha: Madrid, a de

de 20

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES A PARTIR DE 12 AÑOS

TÍTULO DEL PROYECTO: Inducción de tolerancia oral a huevo en pacientes con alergia mediada por anticuerpos IgE

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carmelo Escudero Díez

Introducción y objetivos

Has sido diagnosticado/a de alergia a las proteínas de huevo. Este tipo de alergia es transitoria en la mayoría de los casos, alcanzando la tolerancia del alimento en los primeros años de vida. Sin embargo, en algunos casos persiste y permanece durante años, con el riesgo de reacción, que puede llegar a ser grave tras la ingestión accidental de alimentos o bebidas que contengan proteínas de huevo. Esta situación obliga a revisar cuidadosamente la composición de los alimentos que tomas.

Existe la posibilidad de adelantar la tolerancia mediante una pauta de inducción de tolerancia, que consiste en dar pequeñas cantidades de clara de huevo en polvo. La cantidad de huevo que recibe el paciente aumenta progresivamente cada día hasta alcanzar una cantidad equivalente a una clara de huevo deshidratada. Este tratamiento ha sido utilizado en estudios realizados en otros países obteniéndose buenos resultados.

El objetivo del presente estudio es poder inducir la tolerancia a huevo de manera segura y rápida en pacientes alérgicos a proteínas de huevo.

Debes leer cuidadosamente estas hojas de información y preguntar al médico cualquier duda que pueda tener. Tu participación en el estudio es totalmente voluntaria.

Realización del estudio

En el estudio participarán aproximadamente 60 pacientes/as, y cada paciente permanecerá en el estudio durante 4 meses, pudiendo salir del mismo en cualquier momento, sin sufrir por ello menoscabo alguno en la calidad de su asistencia.

Con el fin de comprobar la eficacia del tratamiento, un grupo de pacientes recibirán el tratamiento de inducción de tolerancia y otro grupo simplemente continuarán realizando la dieta de eliminación de huevo. La asignación a uno u otro grupo se realizará al azar (como si fuera a cara y cruz al lanzar una moneda al aire). Si te corresponde el grupo que va a continuar con la dieta de eliminación de huevo, transcurridos los 4 meses del estudio y si persiste la alergia a las proteínas de huevo, podrás iniciar el tratamiento de inducción de tolerancia si los resultados del estudio han sido favorables.

Si te corresponde entrar en el grupo de tratamiento, el estudio se compone de un mínimo de 11 y un máximo de 15 visitas a lo largo de 4 meses. En las 10 visitas semanales programadas para administrar el tratamiento se te realizará una exploración clínica básica y tomarás la dosis correspondiente de clara de huevo en polvo indicada en el protocolo, hasta comprobar la tolerancia. Deberás permanecer bajo supervisión médica del alergólogo en nuestra sección durante una hora.

En la primera visita y en las visitas de revisión a los 3 y 4 meses se te realizarán pruebas cutáneas a huevo y fracciones (clara, yema, ovoalbúmina, ovomucoide y lisozima) mediante técnica de prick-test (las típicas “pruebas de la alergia”) y se te hará una extracción de sangre. Esto es lo que se hace habitualmente en las revisiones anuales a los pacientes con alergia a proteínas de huevo para valorar su grado de alergia.

A los 3 meses del inicio del tratamiento, se te indicará que retires el huevo de la dieta durante un mes. Trascurrido este mes, acudirás de nuevo a nuestra sección para confirmar la tolerancia del alimento mediante una prueba de exposición. Si se produce una reacción alérgica durante esta exposición, deberás reanudar la pauta de inducción a partir de la última dosis tolerada durante la prueba. En esta visita (4 meses de el inicio del tratamiento), se te realizarán pruebas cutáneas a huevo y fracciones mediante técnica de prick-test y se te hará una extracción de sangre.

Se te pedirá que apuntes en un diario la dosis de clara de huevo en polvo que tomas cada día y si se ha producido alguna reacción.

Si te corresponde el grupo que no va a recibir el tratamiento, continuarás con la dieta sin huevo durante 4 meses. En la primera visita y en la visita de revisión a los 4 meses se te realizarán pruebas cutáneas a huevo y fracciones, se te hará una extracción de sangre y una prueba de exposición a la clara de huevo para comprobar si ya toleras el alimento.

El volumen de sangre por extracción será de 10 cc. El suero obtenido de la muestra de sangre será utilizado para realizar las habituales determinaciones de anticuerpos específicos frente a proteínas de huevo. Además, una parte del suero obtenido será utilizado para analizar los posibles cambios inmunológicos que se produzcan durante el tratamiento, si te corresponde el grupo de tratamiento, o durante la dieta sin huevo, si te corresponde el grupo que no va a recibir el tratamiento. Se seguirá en todo momento la Ley de Investigación Biomédica respecto a las muestras humanas del 3 de Julio de 2007.

La prueba de exposición para comprobar la tolerancia al huevo, se realizará mediante la técnica denominada “doble ciego” que consiste en administrar un día clara de huevo enmascarada en zumo de piña y otro día se cambia el huevo por leche de soja en polvo, sin que lo sepas lo que vas a recibir ni tú ni el médico responsable, con el fin de evitar la influencia de la sensación de reacción por las experiencias previas.

Efectos no deseados (Riesgos del estudio)

Las pruebas cutáneas se realizan en el antebrazo. Son las pruebas que se realizan en la Consulta de Alergia, y se hacen habitualmente para poder diagnosticarte de alergia a proteínas de huevo. La posibilidad de efectos adversos es excepcional (infección del punto de prick, reacción tardía inflamatoria) y más excepcionalmente la posibilidad de síntomas sistémicos al realizarla en caso de extrema sensibilización, como urticaria, clínica de dificultad respiratoria, shock, etc.

La extracción de sangre, de aproximadamente 10 ml, puede ocasionar una pequeña incomodidad en el brazo y hematoma.

La prueba de exposición y la pauta de inducción de tolerancia a dosis progresivas puede producir una reacción alérgica al llegar a una determinada cantidad de clara de huevo en polvo, que puede llegar a ser grave (urticaria, hinchazón de labios y párpados, congestión nasal y ocular, espasmo bronquial, vómitos, diarrea, dificultad respiratoria por hinchazón de las vías respiratorias, caída de la tensión arterial, shock, etc.) y que se trataría inmediatamente con la medicación correspondiente y adecuada para tu edad y peso.

La reacción es la misma que se produciría si por accidente tomaras una cantidad equivalente de huevo en el colegio o en una excursión fuera del domicilio, con la diferencia de que en el Hospital contamos con los medios necesarios para tratarla y controlarla inmediatamente.

Otros riesgos o complicaciones que podrían aparecer, dada tu situación clínica y tus circunstancias personales,
son.....

.....

Criterios de alerta en casa

Si en cualquier momento del estudio presentas síntomas de reacción alérgica (urticaria, hinchazón de labios y párpados, congestión nasal y ocular, espasmo bronquial, vómitos, diarrea, dificultad respiratoria por hinchazón de las vías respiratorias, etc.) además de darte la medicación que tu médico te habrá recomendado y de llevarte a un centro sanitario, tus padres pueden y deben telefonar en cualquier momento del día al médico responsable del estudio para regresar a la consulta antes de la fecha programada.

Retirada del estudio

Tienes derecho a abandonar el estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. En cualquier momento su médico puede decidir finalizar el estudio o retirarte del mismo por motivos de seguridad. Los datos obtenidos de tu participación en el estudio no serán incluidos en el análisis final de los resultados.

Tratamientos alternativos

En cualquier momento puedes decidir libremente no participar en el estudio. Tu médico te informará de la dieta de eliminación de proteínas de huevo que debes seguir y te recomendará un tratamiento para aplicar en caso de ingestión accidental del alimento mientras acudes a un centro sanitario.

Seguirás las revisiones habituales en la Consulta de Alergia sin que ello suponga un menoscabo en tu atención con respecto a otros pacientes y sin que afecte a tu tratamiento actual o futuro por parte de tu médico.

Beneficios

No se pueden garantizar beneficios por tu participación en el estudio, aunque de los resultados que se extraigan del mismo se pueden favorecer a futuros pacientes.

Aspectos éticos y legales del estudio

El diseño de este estudio ha sido evaluado y aprobado por un Comité Ético independiente y se realizará de acuerdo con las normativas legales nacionales.

Si decides participar en este estudio, deberás firmar este consentimiento, en el que se establece que estás de acuerdo voluntariamente en participar y que has leído y entendido la información proporcionada.

Verificación de datos

Los representantes de las autoridades sanitarias podrán revisar los datos médicos importantes de tu historia clínica para confirmar la precisión de los datos recogidos durante el estudio.

La identidad y los datos de tu participación en el estudio son absolutamente confidenciales. Sólo su número de participación te identificará en los registros relacionados con el estudio para poder utilizar los datos, cumpliendo la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

En caso de emergencia o si necesitaras asistencia, consejo u otra información, por favor contacta con:

Dr. Carmelo Escudero Díez

Tfno.: **91 503 59 35 / 606 46 21 91**

- He leído las hojas de información que se me han entregado: SÍ / NO
- He podido hacer preguntas sobre el estudio: SÍ / NO
- He recibido suficiente información sobre el estudio: SÍ / NO

He hablado con el Dr. Carmelo Escudero Díez

- Comprendo que mi participación es voluntaria: SÍ / NO
- Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera y que tengo derecho a revocar el consentimiento de información de datos personales, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos: SÍ / NO

Y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio *Inducción oral de tolerancia a huevo en pacientes con alergia mediada por anticuerpos IgE* de la Sección de Alergología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid.

Fdo:

Fdo:

Nombre:.....

Médico que informa:

.....

Dr. Carmelo Escudero Díez

DNI:.....

Nº Col.: 282852900.

Lugar y fecha: Madrid, a de

de 20

9.2. Anexo II: Registro para la selección de pacientes del estudio sobre ITOH.

REGISTRO PARA LA SELECCIÓN DE PACIENTES DE ESTUDIO SOBRE INDUCCIÓN ORAL DE TOLERANCIA A HUEVO EN PACIENTES CON ALERGIA MEDIADA POR IgE

Identificación del paciente (iniciales nombre y apellidos):

Nº Historia:

Fecha de nacimiento:

Sexo:

Código de entrada en el estudio:

Grupo:

Para asignar por el investigador

A. Cumple todos los criterios de inclusión:

- 1.- Edad: mayor o igual de 5 años y menor de 18 años.
- 2.- Alergia a proteínas de huevo mediada por IgE, cumpliendo los siguientes criterios diagnósticos:
 - Reacciones inmediatas tras la ingestión de huevo con manifestaciones cutáneas (eritema, urticaria y/o angioedema), digestivas (vómitos y/o diarrea aguda) y/o respiratorias (rinitis y/o broncoespasmo) en las 2 primeras horas tras la ingestión de huevo.
 - Pruebas cutáneas ≥ 3 mm e IgE específica $> 0,70$ KU/l para huevo completo o alguna de sus fracciones (clara, yema, ovoalbúmina o ovomucoide).
- 3.- Tras la información de riesgos y beneficios, los padres, aceptan y firman el consentimiento informado.
- 4.- Realizado en las 4 semanas previas a la inducción de tolerancia:
 - Pruebas cutáneas (Prick) ≥ 3 mm e IgE específica (ImmunoCAP, Phadia) $> 0,70$ KU/l para huevo completo o alguna de sus fracciones.
 - Prueba de exposición doble ciego positiva a clara de huevo deshidratada.

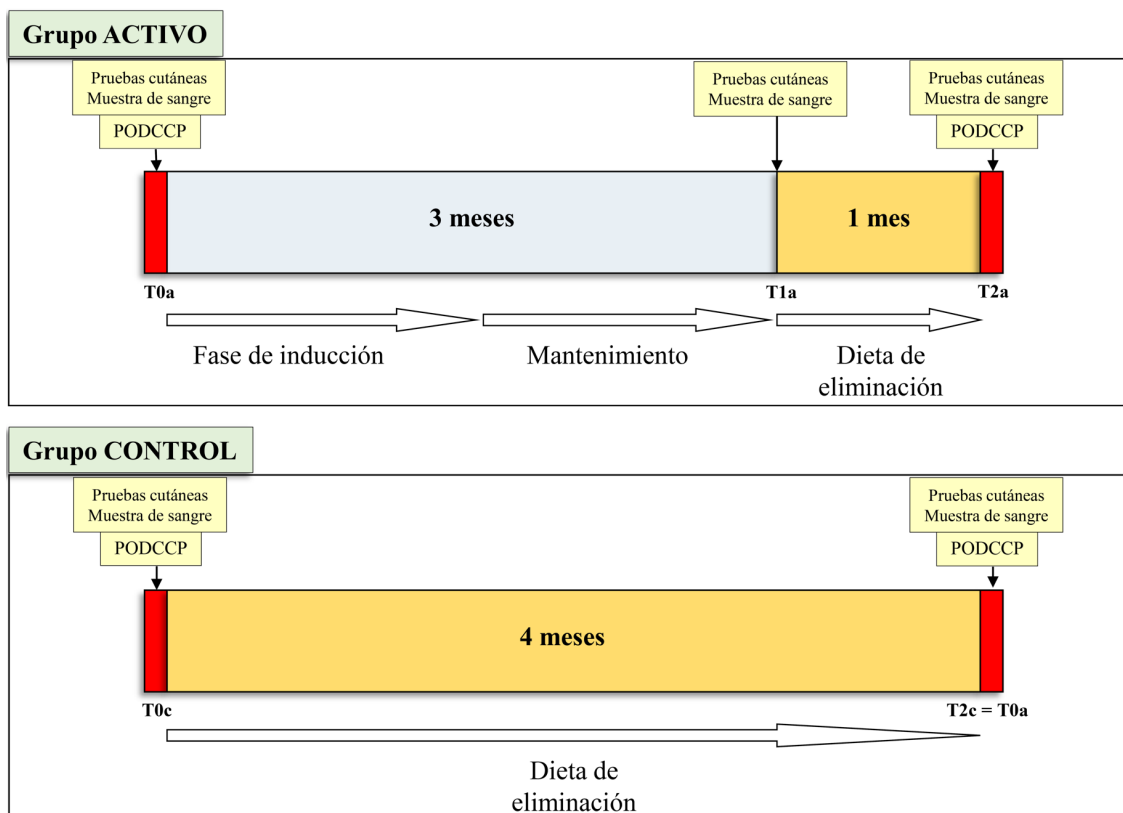
B. No presenta ninguno de los siguientes criterios de exclusión:

- 1.- Antecedentes de anafilaxia extremadamente grave tras el consumo de huevo (por ejemplo, hipoxia, hipotensión y/o pérdida del conocimiento).

- 2.- RAs a huevo no relacionadas con IgE.
- 3.- Esofagitis eosinofílica.
- 4.- Enfermedades malignas.
- 5.- Enfermedades autoinmunes y eficiencias inmunológicas graves.
- 6.- Cualquier referencia a una enfermedad que contraindicase el uso de adrenalina.
- 7.- Hipersensibilidad a cualquier componente del placebo usado para la PODCCP.
- 8.- Padres no colaboradores, no firma de consentimiento informado.

9.3. Anexo III: Esquemas del estudio de investigación y resumen de intervenciones.

Esquemas del estudio de investigación y resumen de intervenciones.



a, activo; $T0a$, momento de la inclusión en el estudio e inicio de la ITOH formando parte del GI; $T1a$, 3 meses después de haber iniciado la ITOH; $T2a$, 1 mes después de haber finalizado la ITOH y haber seguido dieta de eliminación de huevo; *c*, control; $T0c$, momento de la inclusión en el estudio; $T2c$, a los 4 meses de haber mantenido una dieta de eliminación de huevo. Corresponde al $T0a$ cuando el paciente entra a formar parte del nuevo grupo de intervención GI2; **PODCCP**, Prueba de exposición oral con CHD doble ciego controlada con placebo. *Duración variable de las fases de inducción y mantenimiento dependiendo de la aparición de reacciones adversas durante la ITOH y las modificaciones consecuentes del protocolo.

9.4. Anexo IV: Historia clínica y valoración basal.

HISTORIA CLINICA Y VALORACIÓN BASAL

Iniciales de nombre y apellidos:

Nº Historia:

Fecha de nacimiento:

Sexo:

HISTORIA CLINICA DE LA REACCION ALERGICA A HUEVO
--

ANAMNESIS

Edad en la primera reacción (meses):

Sintomatología:

Descripción completa de la reacción adversa desencadenada en relación con la ingestión de huevo:

Intervalo (minutos) entre la ingestión de huevo y la aparición de los síntomas:

Intervalo de tiempo entre la incorporación de huevo a la dieta y el comienzo de los síntomas:

¿Tras la primera toma?: SÍ/NO

Intervalo de tiempo (días):

ANTECEDENTES PERSONALES

Dermatitis atópica: SÍ/NO

Alergia a proteínas de leche de vaca: SÍ/NO

Alergia a proteínas de otros alimentos:

- Pescados: SÍ/NO
- Leguminosas: SÍ/NO
- Frutos secos: SÍ/NO

Asma alérgica: SÍ/NO

Rinitis alérgica: SÍ/NO

ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA: SI/NO

	Asma	Rinitis	Eczema atópico	Alergia alimentos
Madre	SÍ/NO	SÍ/NO	SÍ/NO	SÍ/NO
Padre	SÍ/NO	SÍ/NO	SÍ/NO	SÍ/NO
Hermanos	SÍ/NO	SÍ/NO	SÍ/NO	SÍ/NO

VALORACIÓN BASAL

1. Pruebas cutáneas y extracción de sangre (10 ml):

Fecha:	Prick (diámetro mayor/menor)	CAP (KU/l)
Extracto de huevo		
Clara		
Yema		
Ovoalbúmina		
Ovomucoide		
Clara de huevo: 1/1		
Clara de huevo: 1/10		
Clara de huevo: 1/100		
Clara de huevo: 1/1.000		
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
<i>Alternaria alternata</i>		
Epitelio de perro		
Caspa de gato		
<i>Phleum pratense</i>		
<i>Olea europea</i>		
<i>Cupressus arizonica</i>		

IgE sérica total: UI/ml

2. EXPOSICIÓN ORAL DOBLE CIEGO CONTROLADA CON PLACEBO

- ACTIVO:

Fecha:

Resultado positivo: SI/NO

Positivo:

Dosis umbral de reacción (mg.):

Clínica:

Tratamiento:

- PLACEBO:

Fecha:

Resultado positivo: SI/NO

Positivo:

Dosis umbral de reacción (mg.):

Clínica:

Tratamiento:

9.5. Anexo V: Prueba de exposición oral con CHD doble ciego controlada con placebo.

Dosis no.	Clara de huevo cruda	Clara de huevo deshidratada		
	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Peso (mg)	Contenido de proteínas (mg)
1	0,1	0,1	8	7
2	0,2	0,2	17	13
3	0,5	0,5	42	32
4	1	1	84	65
5	2	2	167	131
6	4	4	335	261
7	6	6	502	392
8	9	9	753	588
9	20,2	20,2	1691	1319
Total	43 ml	43 ml	3600 mg*	2808 mg

* 3600 mg de clara deshidratada equivalen a clara de un huevo de tamaño pequeño.

9.6. Anexo VI: Recetas de enmascaramiento de las pruebas de exposición oral en ciego.

Activo: zumo con clara de huevo deshidratada

Forma de preparación: en un vaso de PLÁSTICO

- 43 cc de zumo de naranja
- 1 cacito rojo + 1 cacito blanco de clara en polvo OVOSEC® (3,57 gr. de clara de huevo deshidratada).
- Azúcar

Placebo: zumo con soja

Forma de preparación: en un vaso de PLÁSTICO

- 43 cc de zumo de naranja
- 1 cacito rojo + 1 cacito blanco de soja en polvo ***PROSOBEE*** (MEAD JOHNSON)
- Azúcar

9.7. Anexo VII: Protocolo de la fase de inducción de ITOH con CHD.

PAUTA DE INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A HUEVO

Iniciales nombre y apellidos:

Nº Historia:

Nº de entrada en el estudio:

FASE DE INDUCCIÓN RÁPIDA (primer día de tratamiento):

Fecha:

- La fase de inducción rápida se realizará en el hospital.
- Duración máxima: 6 horas; Las dosis se administrarán cada 20 minutos
- Final de la fase rápida: aparición de síntomas tras la administración de una dosis o administración de la última dosis (Nº 12)
- Observación tras finalizar la fase rápida: 2 horas

Nº dosis	Cantidad (ml) dilución 0,94 mg/ml ⁽¹⁾		Dosis (mg)	Dosis acumulada (mg)	Dosis de proteínas (mg)	Dosis acumulada de proteínas (mg)
1	VASO A	0,1	0,094	0,094	0,073	0,073
2		0,2	0,188	0,282	0,146	0,219
3		0,4	0,376	0,658	0,293	0,511
4		0,8	0,752	1,41	0,586	1,095
5		1,5	1,41	2,82	1,09	2,19
6		3	2,82	5,64	2,19	4,38
7		6	5,64	11,28	4,39	8,76
8		12	11,28	22,56	8,79	17,52
9		25 (acumulado 49 ml)	23,5	46,06	18,33	35,77
	Cantidad (ml) dilución 9,4mg/ml ⁽²⁾					
10	VASO B	5	47	93,06	36,66	72,27
11		10	94	187,06	73,32	145,26
12		20 (acumulado 35 ml)	188	375,06	146,64	291,26 ⁽³⁾

FASE DE INDUCCIÓN LENTA (segundo día de tratamiento y sucesivos):

DOMICILIO

Fecha:

- La fase de inducción lenta se realizará en el domicilio del paciente.
- Duración: semanas, 1 dosis/día
- Observación tras la administración de cada dosis: 2 horas. El paciente evitará realizar ejercicio físico durante este tiempo.

- La fase de inducción lenta se inicia con la dosis de clara deshidratada de la Tabla I inferior a la última dosis tolerada por el paciente en la fase rápida.
- Se aumentará la dosis una vez por semana si el paciente tolera las dosis anteriores. El aumento de dosis se realiza en el hospital permaneciendo el paciente en observación durante 2 horas.

Dilución		Fecha	Día	Cantidad (gotas/ml)	Concentración	Clara deshidratada (mg)	Proteínas (mg)
A		/ /	1	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
		/ /	2	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
		/ /	3	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
		/ /	4	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
A		/ /	5	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
		/ /	6	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
		/ /	7	1 / 0.03	1 mg/ml	0.03	0.023
A		/ /	8	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
		/ /	9	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
		/ /	10	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
		/ /	11	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
A		/ /	12	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
		/ /	13	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
		/ /	14	12 / 0.40	1 mg/ml	0.40	0.312
A		/ /	15	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
		/ /	16	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
		/ /	17	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
		/ /	18	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
A		/ /	19	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
		/ /	20	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
		/ /	21	4.1	1 mg/ml	4.10	3.19
B		/ /	22	1.8	10 mg/ml	17.95	14
		/ /	23	1.8	10 mg/ml	17.95	14
		/ /	24	1.8	10 mg/ml	17.95	14
		/ /	25	1.8	10 mg/ml	17.95	14
B		/ /	26	1.8	10 mg/ml	17.95	14
		/ /	27	1.8	10 mg/ml	17.95	14
		/ /	28	1.8	10 mg/ml	17.95	14
C ₁		/ /	29	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97
		/ /	30	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97
		/ /	31	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97
		/ /	32	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97
C ₁		/ /	33	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97
		/ /	34	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97

		/	/	35	0.8	100 mg/ml	87.15	67.97
C ₂		/	/	36	2.4	100 mg/ml	241	187.98
		/	/	37	2.4	100 mg/ml	241	187.98
		/	/	38	2.4	100 mg/ml	241	187.98
		/	/	39	2.4	100 mg/ml	241	187.98
C ₂		/	/	40	2.4	100 mg/ml	241	187.98
		/	/	41	2.4	100 mg/ml	241	187.98
		/	/	42	2.4	100 mg/ml	241	187.98
C ₃		/	/	43	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
		/	/	44	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
		/	/	45	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
		/	/	46	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
C ₃		/	/	47	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
		/	/	48	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
		/	/	49	4.5	100 mg/ml	451.28	351.99
C ₄		/	/	50	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
		/	/	51	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
		/	/	52	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
		/	/	55	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
C ₄		/	/	56	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
		/	/	57	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
		/	/	58	18	100 mg/ml	1805.1 (1/2)	1407.99
C ₅		/	/	59	35.7	100 mg/ml	3600 (1)	2784.6
		/	/	60	Clara fresca cruda entera			

Tabla I

- Si presenta reacción de urticaria, angioedema, rinoconjuntivitis, broncoespasmo leve, dolor abdominal y/o vómitos. Tras su resolución volver a administrar la dosis anterior y tras comprobar su tolerancia, continuar con esta dosis en el domicilio y volver a intentar aumentar de dosis en la siguiente semana.
- Si el paciente tolera la última dosis de la pauta de inducción de tolerancia (3.570 mg de clara de huevo deshidratada = 1 CLARA FRESCA), deberá acudir de nuevo al hospital al día siguiente para tomar una clara de huevo fresca. Si el paciente tolera el alimento, deberá continuar tomando en su domicilio, al menos un huevo cada 72 horas hasta que se cumplan 3 meses desde el inicio de la inducción oral de tolerancia a huevo.
- Si por algún motivo se interrumpe su administración durante tres días, informará por teléfono para administrar una dosis de huevo bajo control en la consulta.

RESULTADO DE LA PAUTA DE INDUCCIÓN ORAL DE TOLERANCIA A HUEVO

- Se alcanza la dosis de 3.570 mg de clara de huevo deshidratada con buena tolerancia (Sí/No):
- El paciente tolera una clara fresca de huevo

(Sí /No):

- Si el resultado es negativo:
 - Se alcanza la dosis de mg de clara de huevo deshidratada.
 - Se abandona por mala tolerancia y continúa con la dieta de exclusión de huevo

(Sí/No):

INCIDENCIAS Y COMENTARIOS:

9.8. Anexo VIII: Información para padres y pacientes.

INSTRUCCIONES PARA LOS FAMILIARES DEL PACIENTE DURANTE EL PERIODO DE INDUCCIÓN ORAL DE TOLERANCIA A HUEVO

1. ANTES DE REGRESAR A SU DOMICILIO, COMPRUEBE QUE LE HEMOS DADO EL MATERIAL NECESARIO PARA PREPARAR LAS DOSIS DE HUEVO

2. ¿Cómo PUEDE TOMAR la dosis diaria de huevo?

- Añadirá el volumen de agua indicada al vaso que contiene el huevo en polvo. Puede utilizar zumo de frutas en vez de agua y añadir azúcar a la solución para mejorar su sabor.
- Se recomienda tomar la dosis diaria de huevo en el domicilio entre las 18:00 y las 20:00 horas.

2. Evitará realizar ejercicio físico en las dos horas siguientes a la administración de la dosis de huevo

3. Tomará todos los días (DOSIS) de XAZAL a mediodía

4. ¿COMO RELLENAR EL DIARIO DE SEGUIMIENTO?

- Anotar la cantidad en mg. de huevo que se le da para tomar, en la cuadrícula “Toma de HUEVO en mg.”.
- Si no toma todo el volumen preparado, medir y anotar lo que deja en el apartado “Mililitros de solución que NO toma”.

5. ¿QUE HACER ANTE UNA POSIBLE REACCION ALÉRGICA?

Si tras la toma de la dosis diaria de huevo presenta:

- **Vómitos:**
 - a) Acudirá al día siguiente a la consulta de Alergología del hospital para administrar la siguiente dosis de huevo.
 - b) Poner una cruz (X) en el apartado correspondiente del diario.
- **Rojeces o ronchas alrededor de la boca o en la cara:**
 - a) Administrar: **(DOSIS)** de POLARAMINE JARABE.
 - b) Si la reacción alérgica se repite una 2ª vez, informar al médico por teléfono.
 - c) Poner una cruz (X) en el apartado correspondiente del diario.

- **Rojeces o ronchas en el cuerpo y/o hinchazón de labios o párpados y/o congestión nasal:**
 - a) Administrar: **(DOSIS)** de POLARAMINE JARABE y **(DOSIS)** de PREDNISOLONA o PREDNISONA.
 - b) Acudirá al día siguiente a la consulta de Alergología del hospital para administrar la siguiente dosis de huevo.
 - c) Poner una cruz (X) en el apartado correspondiente del diario.
- **Cambio en la voz y/o opresión en la garganta y/o dificultad para respirar y/o disminución del nivel de conciencia**
 - a) Administrar (POR ESTE ORDEN): ALTELLUS **(DOSIS)**, **(DOSIS)** de POLARAMINE JARABE y **(DOSIS)** de PREDNISOLONA o PREDNISONA.
 - b) Se pondrá en contacto con el médico responsable inmediatamente y acudirá al centro sanitario más próximo a su domicilio.

6. SI PRESENTA ALGUNA ENFERMEDAD (GRIPE, AMIGDALITIS, OTITIS, BRONQUITIS, GASTROENTERITIS U OTRAS)

Anotar en el apartado INCIDENCIAS el día, enfermedad, tratamiento y duración de la enfermedad.

7. ¿QUE HACER EN CASO DE DUDA?

Llamar a su médico

6. NOMBRE Y TELÉFONO DE SU MÉDICO PARA CONSULTA:

Dr. Carmelo Escudero Díez

Telf. Hospital (lunes a viernes por la mañana): **91 503 59 35**

Telf. Móvil: **606 46 21 91**

CALENDARIO DE DOSIS

DÍA	DILUCIÓN	DOSIS	
		mililitros	gotas

PREPARACIÓN DE LAS DOSIS DE HUEVO: DILUCIONES

**DILUCIÓN A
MATERIAL**

- 2 vasos de plástico VACIOS
- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 5 ml
- 1 jeringa 1 ml o 1 cuentagotas

PREPARACIÓN

VASO B: añadir 50 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

VASO A: tomar 5 ml del VASO B y echarlo en uno de los vasos de plástico vacíos. Añadir a este vaso 45 ml de agua

1 ml = 20 gotas

DILUCIÓN B

MATERIAL

- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 1 ml

PREPARACIÓN

Añadir 50 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

DILUCIÓN C₁

MATERIAL

- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 1 ml

PREPARACIÓN

Añadir 10 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

DILUCIÓN C₂

- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 1 ml

PREPARACIÓN

Añadir 20 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

DILUCIÓN C₃

- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 1 ml

PREPARACIÓN

Añadir 40 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

DILUCIÓN C₄

- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 1 ml

PREPARACIÓN

Añadir 90 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

DILUCIÓN C₅

- 2 vasos de plástico con HUEVO EN POLVO
- 1 jeringa 10 ml
- 1 jeringa 1 ml

PREPARACIÓN

Añadir 120 ml de agua a uno de los vasos con HUEVO EN POLVO

9.9. Anexo IX: Clasificación de la gravedad de las reacciones adversas.

Clasificación de la gravedad de las reacciones alérgicas según Clark and Ewan

Clark AT, Ewan PW. Food allergy in childhood. Arch Dis Child 2003;88: 79-81.

1. Leve: eritema cutáneo y/o urticaria y/o angioedema localizados y/o prurito oral
2. Leve: eritema y/o urticaria y/o angioedema generalizados
3. Leve: al menos 1 ó 2, más síntomas gastrointestinales y/o rinoconjuntivitis.
4. Moderada: edema laríngeo leve (cambio en la voz y/o opresión en la garganta) y/o asma leve
5. Grave: disnea intensa y/o síntomas de hipotensión (colapso y/o pérdida de conciencia)

9.10. Anexo X: Calendario y registro de seguimiento.

Inducción oral de tolerancia a huevo (<i>marcar con una cruz lo que corresponda</i>)																
Código de entrada en el estudio:								Año:			Mes:					
Día del mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Toma de HUEVO en mg.																
Mililitros de solución que NO toma																
Rojeces, ronchas en cara																
Ronchas por el cuerpo																
Hinchazón en la cara																
Vómito, dolor abdominal, diarrea																
Cambio en la voz, opresión en la garganta																
Polaramine																
ESTILSONA o Prednisona Alonga 10 mg																
Altellus																
Consulta por teléfono																
Consulta en el hospital																
<i>Se aconseja realizar las tomas de huevo entre las 18:00 y 20:00 horas</i>																
Día del mes	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Toma de HUEVO en mg.																
Mililitros de solución que NO toma																
Rojeces, ronchas en cara																
Ronchas por el cuerpo																
Hinchazón en la cara																
Vómito, dolor abdominal, diarrea																
Cambio en la voz, opresión en la garganta																
Polaramine																
Estilsona o Prednisona Alonga 10 mg																
Altellus																
Consulta por teléfono o en el hospital																

Cada familia recibía tantas hojas de registro como meses transcurrirían hasta la siguiente visita.

9.11. Anexo XI. Cuestionario telefónico de seguimiento.

Consumo de Huevo

1. ¿Cómo consume el huevo?

- a) En todas las presentaciones.
- b) En forma de huevo cocido y/o tortilla muy cocinada.
- c) En forma de huevo frito, pasado por agua, tortilla poco cocinada y/o revuelto.
- d) En forma de mahonesa, merengues, cremas y/o huevo crudo.
- e) Toma el preparado comercial de clara de huevo deshidratada (OVO-PRO®).
- f) Solamente toma alimentos que contienen trazas de huevo.
- g) No consume huevo.

2. ¿Cuántos huevos consume al día?

- a) Uno y alimentos que contienen trazas o pequeñas cantidades de huevo.
- b) Uno, sin tomar otros alimentos que contengan huevo en su composición.
- c) Dos.

3. ¿Con qué frecuencia lo consume?

- a) A diario.
- b) 2-3 veces por semana.
- c) 1 vez por semana.
- d) No consume huevo.

4. ¿Cuál es el tiempo máximo que ha estado sin consumir huevo?

- a) 2 días.
- b) Entre 3 y 5 días.
- c) Entre 6 y 7 días.
- d) Más de una semana y menos de 1 mes.
- e) Más de un mes.

Reacciones Adversas Relacionadas con la Ingestión de Huevo

5. ¿Ha sufrido alguna reacción tras consumir huevo?

- a) Sí.
- b) No.

6. ¿Cuántas reacciones ha sufrido tras tomar huevo durante este tiempo?

- a) Una.
- b) Entre 2 y 5.
- c) Entre 6 y 12.
- d) Más de 12 (se interroga a la familia para que trate de estimar una media de reacciones/año).

7. ¿Cuáles fueron los síntomas que se produjeron durante las reacciones? (Pueden marcarse varias opciones)

- a) Manifestaciones cutáneas locales (eritema y/o habones locales, y/o angioedema).
- b) Manifestaciones cutáneas generalizadas (habones generalizados).
- c) Síntomas digestivos (dolor abdominal, náuseas, vómitos y/o diarrea).
- d) Síntomas respiratorios (rinorrea, congestión nasal, tos, disnea y/o sibilancias).
- e) Cardiovasculares (taquicardia, bradicardia, mareo, somnolencia, pérdida de conciencia).

8. ¿Las reacciones estuvieron relacionadas con algún cofactor?

- a) Sí.
- b) No.

9. ¿Reconocieron el cofactor implicado? (Pueden marcarse varias opciones)

- a) Ejercicio físico.
- b) Consumo de AINE.
- c) Infecciones.
- d) Estrés.

e) Otros (indicar cuáles).

10. ¿Cuál fue el tratamiento que recibió? (Pueden marcarse varias opciones)

- a) Antihistamínicos.
- b) Corticoides.
- c) Adrenalina (número de ocasiones).
- d) Todos.

11. ¿Alguna de las reacciones adversas precisó tratamiento en servicios de Urgencia?

- a) Sí.
- b) No.

Satisfacción relacionada con el tratamiento de inmunoterapia oral
--

12. ¿Le gusta tomar huevo?

- a) Sí.
- b) No.

13. ¿Durante este tiempo ha tenido que dejar de consumir huevo y evitarlo porque tuvo reacciones adversas?

- a) Sí.
- b) No.

14. ¿Cuándo toma huevo tiene miedo de tener una reacción?

- a) Sí.
- b) No.

15. ¿Tiene miedo de tener que dejar de tomar huevo en algún momento?

- a) Sí.
- b) No.

16. ¿Lleva consigo el dispositivo auto-inyector de adrenalina?

- a) Sí.
- b) No.

17. ¿Cumple las recomendaciones dadas por su médico en cuanto a los cofactores que debe evitar cuando toma huevo?

- a) Sí.
- b) No.

18. ¿El paciente cree que su vida ha mejorado desde que puede tomar huevo?

- a) Sí.
- b) No.

19. ¿El paciente hubiese preferido no haber realizado el tratamiento de inmunoterapia oral con huevo?

- a) Sí
- b) No

20. ¿Ustedes hubiesen preferido no haber realizado el tratamiento de inmunoterapia oral con huevo?

- a) Sí.
- b) No.

21. ¿Cómo padres recomendarían este tratamiento a otros pacientes con alergia al huevo?

- a) Sí.
- b) No.

9.12. Anexo XII: Artículos científicos publicados.

9.12.1. Dehydrated egg white: An allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy.

Escudero C, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Pastor-Vargas C, García-Fernández C, Pérez-Rangel I, Ramírez-Jiménez A, Ibáñez MD. Dehydrated egg white: An allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24: 263–269.

ORIGINAL ARTICLE

FOOD ALLERGY AND ANAPHYLAXIS

Dehydrated egg white: An allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy

Carmelo Escudero¹, Silvia Sánchez-García¹, Pablo Rodríguez del Río¹, Carlos Pastor-Vargas², Cristina García-Fernández³, Inmaculada Pérez-Rangel¹, Antonio Ramírez-Jiménez¹ & María Dolores Ibáñez¹

¹Allergy Department, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain; ²Immunology Department, IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ³Public Health Department, Hospital Infanta Sofía, San Sebastian de los Reyes, Madrid, Spain

To cite this article: Escudero C, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Pastor-Vargas C, García-Fernández C, Pérez-Rangel I, Ramírez-Jiménez A, Ibáñez MD. Dehydrated egg white: an allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; **24**: 263–269.

Keywords

dehydrated egg white; desensitization; diagnosis of egg allergy; dried egg; egg oral immunotherapy; oral food challenge; oral tolerance induction; OVO-DES; OVO-PRO

Correspondence

María Dolores Ibáñez, Allergy Department, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Avenida de Menéndez Pelayo 65, 28009 Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 503 5935
Fax: +34 91 503 5935
E-mail: mibanets@salud.madrid.org

Accepted for publication 15 January 2013

DOI:10.1111/pai.12052

Abstract

Background: Raw and cooked eggs are used as allergens in oral food challenge (OFC). Raw egg is the best option, as it keeps proteins intact and retains their allergenicity, albeit microbiologically safe manipulation is difficult. Therefore, the use of dehydrated egg white (DEW) could improve the efficacy and safety profile of OFC. The aim of the study was to compare the allergenicity of DEW, a product that undergoes a double heat treatment (pasteurization and drying), with that of raw egg white (REW) and determine the efficacy of DEW in the diagnosis of egg allergy.

Methods: We conducted a prospective study of 40 egg-allergic patients who visited our outpatient clinic. Each patient underwent OFC with DEW and REW to determine the correlation between the tests. DEW and REW extracts were analyzed using SDS-PAGE. We compared the allergenicity of both extracts using IgE immunoblotting with a serum pool from patients with positive OFC results.

Results: Ten patients (25%) had positive OFC results with both DEW and REW, and the doses that triggered an allergic reaction in each patient were similar ($p > 0.05$). All 30 patients (75%) with a negative OFC result with DEW also had negative OFC results with REW. SDS-PAGE and IgE immunoblotting revealed that the protein composition and IgE-binding capacity of both extracts were virtually identical.

Conclusions: This is the first time that it is shown that the allergenicity of commercially available DEW is equivalent to raw egg whites. *In vivo* and *in vitro* tests showed that processing of DEW does not affect the allergenicity of egg proteins. DEW is an effective and microbiologically safer source of allergen for the diagnosis of egg allergy. Furthermore, DEW can be used in egg oral immunotherapy.

Food allergy is a major public health issue, and its prevalence has increased in the last 15 years (1, 2). Egg allergy is one of the most frequent food allergies in children, with an estimated point prevalence of 1.6% (3). Egg allergy is resolved in most cases by the age of 8 (4, 5), and therefore, appropriate diagnostic procedures are key to revealing the persistence or resolution of the disease. Diagnosis of egg allergy is often determined by skin prick tests (SPT) and/or serum-specific IgE (sIgE) analysis (6), although it needs (OFC) to be confirmed through oral food challenge (7). The allergens generally used for egg OFC are raw, pasteurized, or cooked egg (scrambled egg, omelet, and boiled egg). However, the use of raw egg to perform oral challenge tests in the study of patients allergic to egg ensures stability and allergenicity of

proteins (8). Hence, correct selection of the allergen source is essential. Raw egg is the best material for oral challenge tests as it is not degraded by heat, while protein integrity and allergenicity are preserved. However, use of these products in challenge tests entails a risk of food-borne diseases caused by agents such as *Salmonella* spp (9). Egg products that are processed and pasteurized and available in liquid and dried forms ensure a high level of food safety by preventing the risk of food-borne diseases.

Cooked egg prevents the risk of food poisoning, although allergenicity is diminished (10). In fact, egg is one of the foods whose allergenicity is most altered by cooking or processing. Ovalbumin, lysozyme, and ovotransferrin are heat-labile allergens (11). Ovomucoid, on the other hand, is characterized by

Dehydrated egg white in oral egg challenge

Escudero et al.

its high heat stability, possibly as a result of its strong disulfide bonds (12). The above observations must be taken into consideration when choosing the allergen source for oral food challenges with egg. Moreover, over the last few years, new treatments have been successfully developed for egg allergy such as oral immunotherapy (13–15). Therefore, these issues must also be considered when choosing the allergenic source for oral immunotherapy with egg.

The aim of this study was to compare the allergenicity and efficacy in clinical practice for the diagnosis of egg allergy of a commercially available Dehydrated egg white (DEW), a product that undergoes a double heat treatment (pasteurization and drying), with that of Raw egg white (REW). This is the first time the allergenicity of DEW has been compared with REW.

Materials and methods

Patients

Inclusion criteria for the selection of patients were a clear history of immediate symptoms after egg intake and positive SPT and/or sIgE to egg white, ovomucoid, and/or ovalbumin and written informed consent obtained in accordance with the institution's ethical guidelines for research involving children. Exclusion criteria for the selection of patients were as follows: anaphylactic shock after the intake of egg, non-IgE-mediated adverse reactions to egg, malignant diseases, immunopathologies and/or severe primary or secondary immunodeficiencies, and associated pathologies contraindicating the use of adrenaline.

The patients were prospectively recruited from the allergy department at Niño Jesús University Children's Hospital, Madrid, Spain. The study and informed consent forms were approved by the institution's independent ethics committee (internal code R-0007/11).

Dehydrated egg white

Commercially available DEW was obtained from the producer (Egg Albumin Powder; OVOSEC S.A., Valladolid, Spain). The product is made from eggs of the species *Gallus gallus domesticus*. Briefly, REW is pasteurized (heated to 59°C for 6 min) to eradicate any microorganism (*Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, yeast, and molds) according to the process hygiene and food safety criteria of the Commission Regulation of the European Communities No. 2073/2005 of November 15, 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (16). After pasteurization, pH is adjusted to 6.5–7.5 by addition of citric acid. Oxidizing glucose, catalase, and hydrogen peroxide are then added to remove glucose and prevent Maillard reaction. Finally, pasteurized liquid egg white is passed through a spray tower where it is dried with hot air at 80°C for 1 min. The resulting DEW can be stored at room temperature in the dark for 18 months after production. The protein content of DEW is 78%. According to the manufacturer, 3600 mg of DEW is the equivalent of the egg white contained in a fresh egg.

Skin tests

Skin prick tests were performed according to standard procedure as shown in the European Academy of Allergy and Clinical Immunology position paper (17) by using commercial extracts of egg white (EW) (1 mg/mL), ovalbumin (OVA) (1 mg/mL), and ovomucoid (OVM) (1 mg/mL) (Leti, Madrid, Spain). In addition, SPT were performed using the prick-to-prick method with DEW and REW (18). The DEW extract was prepared by diluting 3600 mg of DEW in 43 mL of saline solution. SPT were performed on the volar surface of the forearm with ALK Lancets (ALK Abelló, Madrid, Spain). Histamine phosphate at 10 mg/mL and normal saline solution were used as positive and negative controls, respectively. The response was read 15 min after puncture, and the results were expressed as the mean wheal diameter (mm). A wheal diameter of 3 mm or more compared with the saline control was defined as a positive reaction.

IgE determinations

Serum-specific IgE (ImmunoCAP; Phadia, Uppsala, Sweden) were performed with native allergens of EW, OVM (Gal d 1) and OVA (Gal d 2).

Correlation between skin prick tests and egg white, ovalbumin, and ovomucoid-specific IgE

To analyze the correlation between the size of SPT and EW, OVA and OVM-specific IgE levels, the Spearman's rank correlation coefficient (SRCC) statistical test was used.

Oral food challenge

All the patients underwent an open OFC with DEW and REW (19). To administer equivalent doses of egg white in the OFC, 43 mL of REW was compared with 3600 mg of DEW diluted in 43 mL of sweetened orange juice. REW was mixed with sugar to enhance flavor without modifying volume. The average weight and volume of the egg white contained in a large size egg was 43.72 g and 43 mL, respectively (Table 1). DEW is easily diluted in liquid at room temperature to provide an easily administered homogeneous mixture. Challenges with DEW and REW consisted of nine doses—0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, and 20.2 mL (cumulative dose of 43 mL)—administered at 30-min intervals (19) to better identify the doses that produced symptoms, both in the REW and in the DEW challenge to compare the results of each challenge on each patient. Challenges were stopped if objective clinical symptoms of allergy were observed (urticaria, rhinitis, vomiting, cough, shortness of breath, and/or hypotension) or when a cumulative dose of 43 mL was tolerated; challenges were classed as positive or negative, respectively. Patients remained hospitalized for observation for 2 h after the administration of the last dose in the case of negative results or 2 h after symptoms resolved in the case of positive results. In positive OFC, doses of DEW and REW eliciting symptoms were compared.

Escudero et al.

Dehydrated egg white in oral egg challenge

Table 1 Dosing schedule of oral challenges with raw egg white and dehydrated egg white

Dose no.	Raw egg white	Dehydrated egg white		
	Volume (mL)	Volume (mL)	Weight (mg)	Protein content (mg)
1	0.1	0.1	8.3	6.5
2	0.2	0.2	16.6	12.9
3	0.5	0.5	41.5	32
4	1	1	83	65
5	2	2	166	129
6	4	4	332	259
7	6	6	498	388
8	9	9	747	583
9	20.2	20.2	1707	1331
	Total: 43 mL	Total: 43 mL	Total: 3600 mg	Total: 2808 mg

3600 mg of dehydrated egg white is equivalent to a raw egg white.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (20) using the Hoefer SE 600 electrophoresis system (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Polyacrylamide concentrations of 14% (w/v) and 5% (w/v) were used for separate and stacking gels, respectively. Samples of DEW and REW were mixed with 0.1 M Tris (pH 6.8) containing 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 10% (w/v) 2-mercaptoethanol, and 0.02% (w/v) bromophenol blue; 20 µg of protein was loaded in each lane. Electrophoresis was carried out in 0.025 M (w/v) Tris-HCl (pH 8.3), 0.192 M (w/v) glycine, and 0.1% (w/v) SDS. Gels were stained with PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas International Inc. Burlington, Canada) to ensure proper protein separation and visualization or used for immunoblotting, as described below.

IgE immunoblotting

DEW and REW protein bands and spots separated by SDS-PAGE were transferred by semi-dry blotting onto nitrocellulose sheets according to the method of Towbin et al. (21). Membranes were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 0.1% Tween 20 (PBS-T), 3% skimmed milk powder, and 3% bovine serum albumin for 2 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with serum diluted by 1/10 in 50 mM Tris-buffered saline solution, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.05% triton X-100. After five washes with PBS-T, the blots were incubated for 1 h at room temperature with mouse antihuman IgE antibody conjugated with horseradish peroxidase (Nordic Immunological Laboratories, Cultec SL, Madrid, Spain) diluted by 1:5000 in PBS containing 0.05% Tween-20 and 1.5% skimmed milk powder. Finally, after five washes with PBS-T, the protein bands were visualized using enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), following the instructions provided by the manufacturer. IgE

immunoblotting was carried out with a serum pool obtained from patients with positive OFC results to DEW and REW.

IgE immunoblotting inhibition

IgE immunoblotting inhibition was performed with both DEW and REW in solid phase and as inhibitors in the liquid phase and a pool of sera obtained from patients with positive OFC results.

Results**Patients**

Forty (76.9%) out of the 52 patients who were invited to participate in the study agreed to do so. Patient age ranged from 2 to 17 yr (mean \pm s.d. age, 6.77 ± 3.96 yr); 67.5% of patients were male. The mean duration of allergy to egg was 5.43 ± 0.97 yr. Egg allergy onset with immediate symptoms in all cases: 37.5% with oral-facial hives, 47.5% with generalized hives, 30% with gastrointestinal symptoms, 10% with rhinitis and 5% with asthma (Table 2). The 87.5% of patients had a history of atopic eczema, 35% of rhinitis, 40% of asthma, and 45% of other food allergy.

Skin tests

The results of SPT to EW, OVA, OVM, REW, and DEW are shown in Tables 2 and 3. The positive predictive value of SPT for EW, OVA, and OVM was 25%, 33%, and 38%, respectively. Prick-to-prick results for REW and DEW were positive in all patients. SPT showed no significant differences between REW and DEW extracts in patients with negative OFC (mean, 4.81 and 4.37 mm, respectively; $p > 0.05$) and in patients with positive OFC (mean, 8.4 and 7.1 mm, respectively, $p > 0.05$). No discrepancies were observed in each patient.

IgE determinations

The results of sIgE determination to egg white, ovalbumin, and ovomucoid are shown in Table 2. The positive predictive value of sIgE for EW, OVA, and OVM was 38%, 37% and 39%, respectively.

Correlation between skin prick tests and egg white, ovalbumin, and ovomucoid-specific IgE

SRCC between EW-SPT and EW-specific IgE was 0.7, between OVA-SPT and OVA-specific IgE was 0.27, and between OVM-SPT and OVM-specific IgE was 0.74. These correlations were statistically significant for EW and OVM ($p < 0.05$).

SDS-PAGE

The protein profile of the REW and DEW extracts was very similar. The main proteins were observed at 14, 37, 45, and 77 kDa (Fig. 1).

Dehydrated egg white in oral egg challenge

Escudero et al.

Table 2 Clinical and immunological characteristics of patients at the time of study

No.	Age (yr)	FAR (symptoms)	SPT (mm) (commercial extracts)			sIgE (kU/l)			OFC
			EW	OVA	OVM	EW	OVA	OVM	
1	17	GU + GI	3	3	3	ND	ND	ND	NEG
2	16	OU + GI	5	3	4	1.62	1.75	1.91	NEG
3	15	GU + R + GI	4	5	3	0.5	0.35	0.36	NEG
4	14	GU	6	4	4	3.15	1.8	2.15	NEG
5	13	GI	5	0	0	0.75	1.04	<0.35	NEG
6	12	OU + GI	5	4	6	0.92	1.1	1.09	NEG
7	10	GU + A	7	5	4	0.53	0.35	0.56	NEG
8	9	OU	5	3	4	ND	ND	ND	NEG
9	9	GU	4	0	5	ND	ND	ND	NEG
10	11	OU + GI	4	0	0	ND	ND	ND	NEG
11	8	R	6	0	3	0.69	0.72	0.68	NEG
12	8	OU	5	4	6	0.88	1.11	0.96	NEG
13	6	OU	7	3	4	1.08	1.29	0.65	NEG
14	7	OU	5	3	3	ND	ND	ND	NEG
15	6	GU + A	5	4	3	1.17	1.38	0.91	NEG
16	4	OU	5	3	0	ND	ND	ND	NEG
17	4	OU	3	0	0	ND	ND	ND	NEG
18	2	OU	3	3	0	0.48	0.58	0.71	NEG
19	4	OU	3	0	3	ND	ND	ND	NEG
20	4	OU	3	3	0	ND	ND	ND	NEG
21	5	GU	3	3	0	0.35	0.35	0.35	NEG
22	3	OU	4	0	4	<0.35	2.11	<0.35	NEG
23	5	GI	3	0	0	1.07	0.61	0.75	NEG
24	2	OU	3	3	0	<0.35	<0.35	<0.35	NEG
25	3	OU	4	0	0	<0.35	<0.35	<0.35	NEG
26	5	GU	4	0	0	0.41	0.45	<0.35	NEG
27	2	OU	3	3	0	<0.35	<0.35	<0.35	NEG
28	3	GU	0	3	0	ND	ND	ND	NEG
29	3	OU + GI	3	3	4	0.59	0.68	0.4	NEG
30	3	OU	3	3	3	0.45	0.69	0.48	NEG
31	7	GU	5	3	6	1.42	1.2	1.76	POS
32	7	OU + GI	6	5	4	398	260	256	POS
33	6	OU + R + GI	6	3	5	6.53	8.49	2.23	POS
34	6	GU	6	5	6	9.29	12.5	9.84	POS
35	5	GI	7	3	5	15	4.21	8.84	POS
36	5	GU + R	6	4	0	0.98	1.38	<0.35	POS
37	6	GI	6	2	5	13.7	11.3	2.46	POS
38	5	GU	5	3	4	0.63	0.83	0.4	POS
39	6	OU	5	3	4	1.1	1.01	0.9	POS
40	5	GI	5	5	5	5.79	4.77	6.57	POS

No., patient number; FAR, first allergic reaction after egg ingestion; OU, oro-facial urticaria; GU, generalized urticaria; GI, gastrointestinal symptoms; R, rhinitis; A, asthma; SPT, skin prick tests; EW, egg white; OVA, ovalbumin; OVM, ovomucoid; sIgE, specific IgE; ND, not performed; OFC, oral food challenges; NEG, negative; POS, positive.

IgE immunoblotting and IgE immunoblotting inhibition

IgE immunoblotting showed that sera recognized the same bands in both extracts. The molecular weights of the recognized bands were, approximately, 14, 37, 45, 55, 66, and 77 kDa (Fig. 1). In addition, immunoblotting inhibition showed that the behavior of DEW and REW was identical (Fig. 2).

Challenge tests

The time between challenges ranged from 1 to 17 days. Ten patients (25%) had a positive result in both oral challenges, and 30 patients (75%) had a negative result in both oral challenges (Table 2). In all cases, positivity and negativity were consistent for both types of egg white. In the case of a positive OFC result, no significant differences were observed between

Escudero et al.

Table 3 Patients with positive oral food challenges: Results of prick-to-prick tests and doses that triggered symptoms and symptoms observed during the challenge

	Prick-to-prick (mm)		OFC			
	REW	DEW	OFC with REW	OFC with DEW	Dose (mL)	Symptoms
No.						
31	6.5	5.5	6	9	GI	
32	9.5	7.0	0.2	0.2	OU + GI	
33	7.0	7.0	2	6	OU + GI	
34	9.5	8.0	0.2	0.2	OU + GI	
35	9.5	6.0	2	2	GI	
36	7.5	4.5	1	1	OU + GI	
37	9.5	9.5	6	9	R + GI	
38	7.0	5.5	2	2	OU + GI	
39	7.0	8.0	1	1	OU + GI	
40	11.0	10.0	2	4	R + GI	

No., patient number; REW, raw egg white; DEW, dehydrated egg white; OFC, oral food challenge; OU, oro-facial urticaria; GI, gastrointestinal symptoms; R, rhinitis.

the doses that elicited allergic symptoms when using DEW and REW (mean, 3 and 2.1 mL, respectively; $p > 0.05$) (Table 3 and Fig. 3). Six of the 10 patients (60%) with positive challenge results had symptoms with the same dose in both the DEW challenge and in the REW challenge; in three patients, the challenges were positive with a difference of one dose and in one patient with a difference of two doses. No differences in symptoms were observed during the positive challenges with DEW and REW. The clinical manifestations in the 10 positive OFC with DEW were skin symptoms ($n = 6$), gastrointestinal symptoms ($n = 7$), and rhinitis ($n = 2$); the clinical manifestations in the 10 positive OFCs with REW were skin symptoms ($n = 4$), gastrointestinal symptoms ($n = 7$), and rhinitis ($n = 3$) (Table 3).

Discussion

In this study, the results of the skin tests and oral challenges show that DEW maintains the same allergenicity *in vivo* as

Dehydrated egg white in oral egg challenge

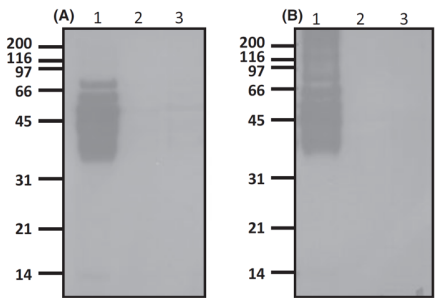


Figure 2 IgE immunoblotting inhibition. Panel A, solid phase with raw egg white; Panel B, solid phase with dehydrated egg white; Lane 1, IgE immunoblotting; Lane 2, inhibition with dehydrated egg white; Lane 3, inhibition with raw egg white.

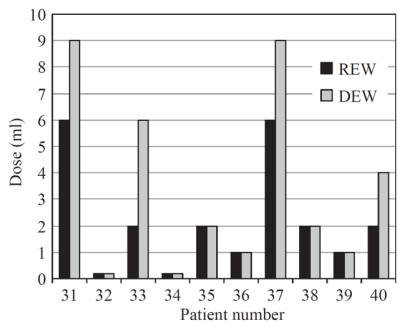
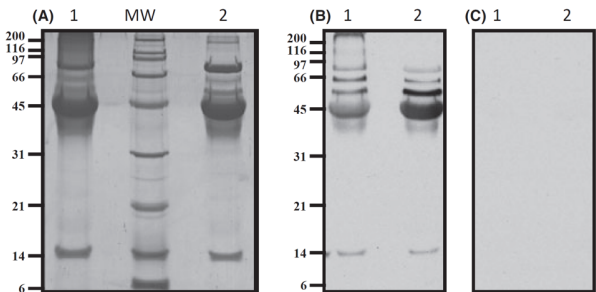


Figure 3 Patients with positive oral food challenges: doses that elicited symptoms.

Figure 1 Panel A, SDS-PAGE with dehydrated egg white (lane 1) and raw egg white (lane 2); MW, molecular weight (kDa). Panel B, IgE immunoblotting with a serum pool from egg-allergic patients with positive challenge results to DEW and REW. Panel C, IgE immunoblotting negative control with sera from non-atopic patients.



REW, given that we observed no inconsistent results in both tests, no significant differences in the doses that led to symptoms in the positive challenges and no significant differences in symptoms observed during the positive challenges with DEW and REW. The results of IgE immunoblotting and IgE immunoblotting inhibition revealed that DEW maintained heat-sensitive egg white allergens intact and that these were similar to those of REW.

Some foods may contain cooked egg or raw egg among their ingredients. To date, there is no consensus as to whether oral challenge with egg in allergic patients should be performed first, with raw egg or with cooked egg (8). Osborne et al. (22) demonstrated that in a population of patients with raw egg allergy diagnosed by oral challenge, 80.3% of patients tolerated baked egg. Patients with low IgE levels are more likely to tolerate cooked egg in a specific challenge. However, these patients may remain at risk for several years with foods containing raw eggs (e.g. pastry, homemade mayonnaise, sauces, cakes, meringue, ice cream) (23). The allergenicity of egg proteins depends on their resistance to heat (10). Ovomucoid is highly heat-stable (12), whereas ovalbumin is relatively heat-labile. Exposure of ovalbumin to a temperature of 80°C for 3 min decreases its IgE-binding activity by 90% (11, 24). Urisu et al. (25) analyzed OFC performed in patients with high IgE antibody values to egg white to compare the allergenicity of three different egg white preparations. The study showed that heat treatment (90°C for 60 min) reduced the allergenic activity of egg white; in fact, 21 of 38 patients (55.3%) with positive immediate reactions to a laboratory-made freeze-dried egg white had negative responses to heated egg white. Therefore, DEW can be used as an allergen source for oral challenge tests without the risk of false negatives that could occur in patients allergic to heat-labile proteins who tolerate cooked egg, but not foods containing raw eggs.

We observed that the double heat treatment (pasteurization and drying) the egg white undergoes to obtain DEW does not affect the allergenicity of its proteins or its capacity to bind to IgE. Our results are consistent with those of Jurado-Palomo et al. (26) who found no allergenic differences *in vitro* or *in vivo* between raw and pasteurized egg white. The present study also showed that the second heat treatment after pasteurization to obtain DEW – drying with air at 80°C for 1 min – does not affect the allergenicity of the proteins.

Raw eggs may be contaminated by *Salmonella enteritidis*, which is a risk factor for food-borne diseases (27). The European Food Safety Authority has shown that in the European Union, egg is still the most frequently implicated source in food-borne human salmonellosis. *Salmonella enteritidis* is the only human pathogen that contaminates eggs routinely (28). One of the key interventions aimed at preventing contamination and growth of *Salmonella* spp. in eggs is education of consumers and food workers about the risk of consuming raw or undercooked eggs (9). Healthcare

professionals are not certified food handlers and so must handle food as safely as possible to avoid contamination or deterioration. Hence, raw egg should be avoided in OFC. In addition, DEW through the pasteurization and drying processes ensures microbiological safety of the product compared with other egg products such as freeze-dried or lyophilized egg that do not undergo pasteurization (29). Dehydrated egg removes the risk of food poisoning.

DEW has a shelf life of 18 months and does not need refrigeration, as compared to pasteurized egg white that has a shelf life of 3 days after opening the packaging and needs refrigeration. The product is easy to prepare and allows for homogeneous doses, accurate quantification of protein per dose, and blind challenge. These advantages could equally apply to products subjected to the same heat treatments of other DEW manufacturing companies.

Moreover, DEW is an effective allergen for oral immunotherapy treatments in egg-allergic patients (15, 30). In oral immunotherapy with egg, DEW is useful, because treatment starts with very small doses of food during the first few days, and dosing is simple and reproducible.

The DEW analyzed is a commercially available and inexpensive product useful for daily clinical practice in the diagnosis of egg allergy. This product is currently marketed in individual doses with different weights (amounts) that can be used for oral challenge or oral immunotherapy (OVO-DES and OVO-PRO; Nutrición Médica, Madrid, Spain).

We conclude that there are no *in vivo* or *in vitro* allergenic differences between DEW and REW. This is the first time that the allergenicity of commercially available dehydrated egg white is demonstrated as equivalent to that of raw egg. DEW is useful, as it can be used as an allergen source in oral challenge tests for diagnosis of any patient with egg allergy, including patients who are allergic to heat-labile egg proteins. Furthermore, DEW eliminates the danger of *Salmonella* spp., has advantages over pasteurized egg white, such as long shelf life without refrigeration, and ensures homogeneity of the prepared doses. Finally, DEW is a suitable source of egg protein for oral immunotherapy, because it enables small doses to be prepared and is therefore easier to manipulate than raw egg.

Acknowledgments

The authors are most grateful for the extensive work of our nurses and nurse assistants in our daily practice and especially for their contribution to the clinical work of this manuscript: Catalina Quiñero, Inmaculada Sanz, Ascensión López, Esperanza Doval, Carmen Ballesteros, and María Jesús Jiménez.

Conflict of interest

The authors of this paper declare no conflict of interests with OVOSEC S.A., Spain and Nutrición Médica S.L., Spain.

Escudero et al.

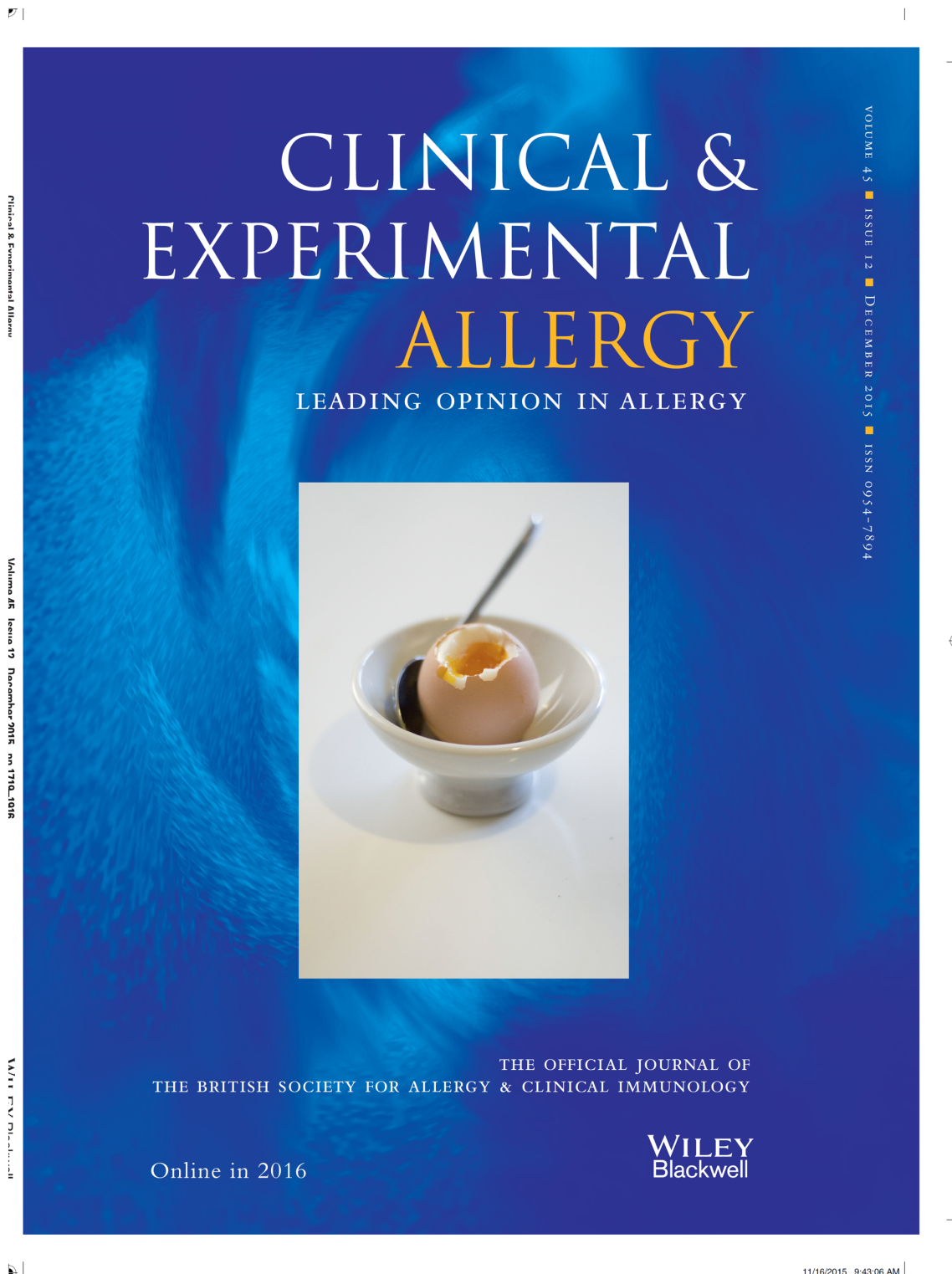
Dehydrated egg white in oral egg challenge

References

- Prescott S, Allen KJ. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; **22**: 155–60.
- McBride D, Keil T, Grabenhenrich L, et al. The EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; **23**: 230–9.
- Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Host A, Bindslev-Jensen C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; **16**: 67–73.
- Boyano-Martínez T, García-Ara C, Díaz-Pena JM, Martín-Esteban M. Prediction of tolerance on the basis of quantification of egg white-specific IgE antibodies in children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **110**: 304–9.
- Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood R. The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**: 1413–7.
- Diéguez MC, Cerecedo I, Muriel A, Zamora J, Abraira V, Camacho E, Antón M, de la Hoz B. Utility of diagnostic tests in the follow-up of egg-allergic children. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**: 1575–84.
- Wainstein BK, Studdert J, Ziegler M, Ziegler JB. Prediction of anaphylaxis during peanut food challenge: usefulness of the peanut skin prick test (SPT) and specific IgE level. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; **21**(4 Pt 1): 603–11.
- Nowak-Węgrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock S, Sicherer SH, Teuber SS. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **123**: S365–83.
- Braden CR. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 512–7.
- Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. *J Agric Food Chem* 2008; **56**: 4874–900.
- Mine Y, Zhang JW. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 2679–83.
- Hirose J, Kitabatake N, Kimura A, Narita H. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; **68**: 2490–7.
- Patriarca C, Romano A, Venuti A, Schiavino D, Di Rienzo V, Nucera E, Pellegrino S. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol* 1984; **12**: 275–81.
- Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewé F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 2007; **62**: 1261–9.
- Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med* 2012; **367**: 233–43.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union.
- European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Position Paper: Immunotherapy* 1993; **48**(suppl):7–35.
- Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 1983; **38**: 167–72.
- Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; **59**: 690–7.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–5.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 4350–4.
- Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **127**: 668–76.e1–2.
- Eigenmann PA. Anaphylactic reactions to raw eggs after negative challenges with cooked eggs. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **105**: 587–8.
- Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RZ, Sampson HA. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1994; **93**: 1047–59.
- Urisu A, Ando H, Morita Y, et al. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **100**: 171–6.
- Jurado-Palomo J, Fiandor-Román AM, Bobolea ID, Sánchez-Pastor S, Pascual C, Quirce S. Oral challenge with pasteurized egg white from *Gallus domesticus*. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; **151**: 331–5.
- Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol* 2001; **3**: 421–30.
- Anonymous. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request of the European Commission on a quantitative microbiological assessment on *Salmonella* in meat. *EFSA J* 2008; **625**: 5–32.
- Matsuoka DM, Costa SF, Mangini C, et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. *J Hosp Infect* 2004; **58**: 122–7.
- Itoh N, Itagaki Y, Kurihara K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergol Int* 2010; **59**: 43–51.

9.12.2. Early sustained unresponsiveness after short-course egg oral immunotherapy: a randomized controlled study in egg-allergic children

Escudero C, Rodríguez del Río P, Sánchez-García S, Pérez-Rangel I, Pérez-Farinós N, García-Fernández C, Ibáñez MD. Early sustained unresponsiveness after short-course egg oral immunotherapy: a randomized controlled study in egg-allergic children. *Clinical & Experimental Allergy* 2015;45: 1833–1843. Editor's Choice.



Clinical & Experimental Allergy

VOLUME 45, ISSUE 12, DECEMBER 2015

Contents

1719 **Publisher's Note**1720 **Editor's Choice****Editor-in-Chief****Editorial**

- 1721 C. J. Corrigan, Q. Hamid, R. E. O'Hehir and A. J. Wardlaw
Farewell

Special Article

- 1723 B. J. Hales, N. Hizawa, M. Jenmalm, E. Sverremark-Ekström and A. J. Wardlaw
Developments in the field of allergy in 2014 through the eyes of Clinical and Experimental Allergy

Editorial

- 1746 A. J. Wardlaw, K. Woolnough and C. H. Pashley
Lassoing a chimera: the semantics of allergic fungal airway disease

Reviews

- 1750 J. Yorke, S. Fleming, C. Shuldharm, H. Rao and H. E. Smith
Nonpharmacological interventions aimed at modifying health and behavioural outcomes for adults with asthma: a critical review
- 1765 V. N. Maturu and R. Agarwal
Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis

Original Article

- Asthma and Rhinitis*
- 1779 L. Mastalerz, N. Celejewska-Wójcik, K. Wójcik, A. Gielicz, A. Cmiel, M. Ignacak, K. Oleś, A. Szczeklik and M. Sanak
Induced sputum supernatant bioactive lipid mediators can identify subtypes of asthma
- 1790 H. Tanimoto, Y. Fukutomi, H. Yasueda, Y. Takeuchi, A. Saito, K. Watai, K. Sekiya, T. Tsuburai, K. Asano, M. Taniguchi and K. Akiyama
Molecular-based allergy diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in *Aspergillus fumigatus*-sensitized Japanese patients
- Clinical Mechanisms in Allergic Disease*
- 1801 J. Wu, M. C. F. Prosperi, A. Simpson, E. M. Hollams, P. D. Sly, A. Custovic and P. G. Holt
Relationship between cytokine expression patterns and clinical outcomes: two population-based birth cohorts
- Basic Mechanisms in Allergic Disease*
- 1812 T. Xie, G. Luo, Y. Zhang, X. Wang, XY. Wang, M. Wu and GP. Li
Rho-kinase inhibitor fasudil reduces allergic airway inflammation and mucus hypersecretion by regulating STAT6 and NFκB

Epidemiology of Allergic Disease

- 1823 Z. Yang, W. Zheng, E. Yung, N. Zhong, G. W. K. Wong and J. Li
Frequency of food group consumption and risk of allergic disease and sensitization in schoolchildren in urban and rural China

Clinical Allergy

- 1833 C. Escudero, P. Rodríguez del Río, S. Sánchez-García, I. Pérez-Rangel, N. Pérez-Farinos, C. García-Fernández and M. D. Ibáñez
Early sustained unresponsiveness after short-course egg oral immunotherapy: a randomized controlled study in egg-allergic children

Experimental Models of Allergic Disease

- 1844 M. Asaduzzaman, A. Nadeem, N. Arizmendi, C. Davidson, H. L. Nichols, M. Abel, L. I. Ionescu, L. Puttagunta, B. Thebaud, J. Gordon, K. DeFea, M. D. Hollenberg and H. Vliagoftis
Functional inhibition of PAR₂ alleviates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation

Allergens

- 1856 M. B. C. Dillon, V. Schulten, C. Oseroff, S. Paul, L. M. Dullanty, A. Frazier, X. Belles, M.-D. Piulachs, C. Visness, L. Bacharier, G. R. Bloomberg, P. Busse, J. Sidney, B. Peters and A. Sette
Different Bla-g T cell antigens dominate responses in asthma versus rhinitis subjects

Research Letter

- 1868 S. F. Walton, A. Slender, S. Pizzuto, K. E. Mounsey, F. Opresecu, W. R. Thomas, B. J. Hales and B. J. Currie
Analysis of IgE binding patterns to house dust mite allergens in scabies-endemic communities: insights for both diseases

Correspondences

- 1873 F. L. M. Ricciardolo, V. Sorbello, S. Conticello and G. Ciprandi
Th17 polarization and upper airways: new insights
- 1875 Y. Liu, M. Zeng and Z. Liu
Re: CEA-2015-0096-CR-AJW, Th17 polarization and upper airways: new insights

Abstract

- 1876 Abstracts of the 2015 Annual Meeting 4–6 September 2015
Telford International Centre UK

1914 Erratum**1915 Forthcoming Meetings**WILEY
Blackwell

This journal is available online at Wiley Online Library.
Visit wileyonlinelibrary.com to search the articles and
register for table of contents e-mail alerts.

Printed in Singapore by
Markono Print Media Pte Ltd

Discover this journal online at
Wiley Online Library
www.wileyonlinelibrary.com/journal/cea



doi: 10.1111/cea.12604

Clinical & Experimental Allergy, 45, 1833–1843

© 2015 John Wiley & Sons Ltd

ORIGINAL ARTICLE Clinical Allergy

Early sustained unresponsiveness after short-course egg oral immunotherapy: a randomized controlled study in egg-allergic children

C. Escudero¹, P. Rodríguez del Río¹, S. Sánchez-García¹, I. Pérez-Rangel¹, N. Pérez-Farínós², C. García-Fernández³ and M. D. Ibáñez¹¹Allergy Department, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, IIS-Princesa, Madrid, Spain, ²Preventive Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain and ³Preventive Medicine Department, Hospital Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain

Clinical & Experimental Allergy

Summary

Background No studies have evaluated the potential of egg oral immunotherapy (egg-OIT) to induce sustained unresponsiveness after discontinuing therapy following short-term treatments.

Objective We assessed the efficacy of short-course egg-OIT to induce sustained unresponsiveness.

Methods Sixty-one egg-allergic children, 5 to 17 years old, with positive double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC) to dehydrated egg white (EW) were randomized to receive egg-OIT (OITG) for 3 months (maintenance dose one undercooked egg every 48 hours) or to continue egg avoidance diet (control group, CG) for 4 months. Children who completed egg-OIT avoided egg for 1 month. At 4 months, both groups underwent a DBPCFC. OITG participants who passed this challenge were instructed to add egg to their diet *ad libitum*. Immune markers were studied at different time points.

Results Ninety-three percent (28/30) of OITG children were desensitized in a median of 32.5 days (IQR, 14 days). At 4 months, 1/31 (3%) in CG passed DBPCFC and 11/30 (37%) of OITG (95% CI, 14 to 51%; $P = 0.003$), all of them were consuming egg at 36 months. A decrease in EW, OVA and OVM skin test results and OVA-specific IgE (sIgE) levels was observed on OITG at 4 months ($P = 0.001$). EW-, OVA- and OVM-sIgE levels prior to the start of egg avoidance diet were lower in OITG children who passed DBPCFC at 4 months than in those who did not pass it. EW- and OVM-sIgE showed the best diagnostic performance in predicting DBPCFC result at 4 months. Levels above optimal EW-sIgE cut-off of 7.1 kU/L indicated 90% probability of failing DBPCFC.

Conclusion This is the first demonstration of sustained unresponsiveness with a three-month egg-OIT protocol. Almost all treated subjects were desensitized and 37% achieved sustained unresponsiveness. EW-sIgE levels at the end of treatment predicted sustained unresponsiveness. This protocol shows a new approach to OIT for egg-allergic children.

Keywords clinical tolerance, desensitization, egg allergy, food allergy, oral immunotherapy, sustained unresponsiveness

Submitted 8 March 2015; revised 20 July 2015; accepted 27 July 2015

Correspondence:

M. D. Ibáñez, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Allergy Department, Avenida de Menéndez Pelayo, 65, 28009 Madrid, Spain.

E-mail: mibanezs@salud.madrid.org

Cite this as: C. Escudero, P. Rodríguez del Río, S. Sánchez-García, I. Pérez-Rangel, N. Pérez-Farínós, C. García-Fernández, and M. D. Ibáñez. *Clinical & Experimental Allergy*, 2015 (45) 1833–1843.

Introduction

Food allergy is an important health concern that has become increasingly prevalent in the past 10 years [1]. Up to 10% of one-year-old children are food allergic [2]. Egg and milk are the most common causes of food allergy in childhood, affecting 1.6% to 8.9% of children between 1 and 3 years of age [2–4]. In addition, egg allergy persists in 49–88% of children at 6 years of age [5, 6] and in up to 32% at 16 years of age [5]. Food

allergy impairs the quality of life of allergic children [7], impacts on the daily activities of children and their families [8] and is a life-threatening condition [9] where severe allergic reactions can occur [10].

To provide a better treatment rather than the limited current standard of care based on food avoidance, new therapeutic strategies, such as oral immunotherapy (OIT), are being researched. Food immunotherapy represents a potential etiological treatment and one step further in the treatment of food allergy.

Egg-OIT is a great developing treatment in the last 6 years [11–20]. To date, most studies have focused on desensitization [11–20], where the food tolerance is maintained only due to its uninterrupted regular intake. Only scattered studies have analysed sustained unresponsiveness (SU) [11, 14, 16, 18], in which tolerance is maintained after a withdrawal of the intake for an extended period of time. Unlike other OIT protocols to date [11, 14, 16, 18], this study evaluates the SU after a short-course OIT with a target maintenance dose of one raw egg white.

We present a randomized controlled study of the safety and efficacy of an egg-OIT protocol to induce SU in a short period of time in children over 5 years old with egg allergy.

Methods

Trial design

Controlled randomized trial investigating the safety and efficacy of egg-OIT treatment for 3 months to obtain SU compared with egg avoidance diet, in children with IgE-mediated egg allergy.

Participants

Patients aged between 5 and 17 of both genders, egg-allergic children who followed egg avoidance diet including baked and extensively heated egg, were invited to participate in the study and were consecutively recruited at the Department of Allergy, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús in Madrid, Spain. Patients were recruited between January and October 2009. Full follow-up was completed in February 2013.

Inclusion criteria were as follows: history of symptoms of allergic reaction immediately or within two hours following egg ingestion, positive skin prick test (SPT) (≥ 3 mm) and specific IgE (sIgE) levels ≥ 0.7 kU/L for egg white (EW), ovalbumin (OVA) and/or ovomucoid (OVM), and a positive double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC) to dehydrated EW at enrolment. Participants were excluded if they had a history of extremely severe anaphylaxis after egg consumption (e.g. hypoxia, hypotension, loss of consciousness), egg non-IgE-mediated adverse reactions, eosinophilic esophagitis, malignant diseases, autoimmune diseases, severe immune deficiencies, any baseline disease contraindicating the use of epinephrine and/or allergy to any component of the placebo-controlled challenge.

Baseline parameters were recorded as individual potential predictors to developing SU (variables considered: baseline age, gender, history of asthma, history of previous anaphylaxis to egg ingestion).

Randomization and generation of study groups

The allocation of patients to the intervention and control groups was performed after their acceptance to participate in the study and provided they met all the selection criteria and none of the exclusion criteria. Participants were assigned to groups in a 1 : 1 ratio using a computer-generated randomization table (Fig. 1).

Intervention group (OITG): Children received egg-OIT for 3 months followed by egg avoidance diet for 1 month. Control group (CG): Children continued egg avoidance diet during 4 months.

At baseline, immune markers were analysed in OITG and CG. Three months after starting egg-OIT, prior to the start of egg avoidance diet for 1 month, immune markers were analysed in OITG. Four months after the study had begun, children in OITG and CG underwent a DBPCFC and immune markers were determined.

Study supervision

The study protocol and consent forms were approved by the Institution's Independent Ethics Committee. Written informed consent was signed by the parents or guardians according to the ethical guidelines of the institution for research in children, and written informed assent was obtained from children over 11 years.

The authors assure the accuracy of data and analysis, as well as compliance with the established protocol.

Double-blind placebo-controlled food challenge

The DBPCFC active and placebo challenges were performed on different days [21]. The allergen source used for active challenge was dehydrated EW (OVOSEC SA, Valladolid, Spain), also called dried EW or EW powder [11, 15, 16, 18]; the product retains allergenicity of raw EW proteins as we confirmed in a previous study [22]. According to the manufacturer, 3600 mg of product is equivalent to one medium size EW and its protein content is at least 78% (2808 mg).

In each of the 2 days of the DBPCFC, nine doses were administered. The dosage of verum oral challenge consisted of the administration of 7, 13, 32, 65, 129, 259, 388, 583 and 1332 mg of EW protein (cumulative dose 2808 mg) at 20-min intervals. Passing meant subjects successfully consumed the maximum dose of dehydrated EW. The test was considered positive if objective symptoms developed (i.e. hives, sneezes, runny nose, cough, and respiratory distress), if subjective but mild–moderate symptoms (oral pruritus, abdominal pain) persisted over 40 min or if subjective but severe symptoms (severe abdominal pain) appeared regardless of its

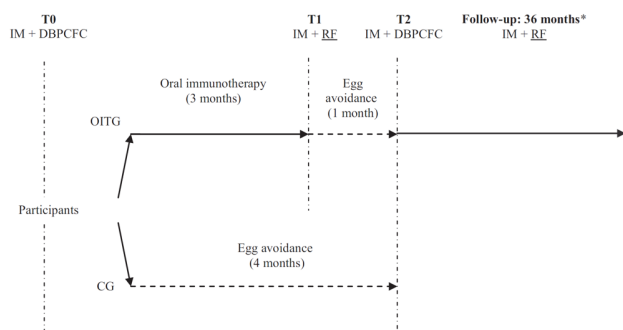


Fig. 1. Study outline. T0, Baseline, T1, 3 months after starting egg-OIT; T2, 4 months after the study had begun; IM, immune markers (skin tests, sIgE and sIgG₄); DBPCFC, double-blind placebo-controlled food challenge; OITG, intervention group; CG, control group; RF, registry forms (egg-OIT compliance and record of adverse reactions). *OITG children who passed DBPCFC at T2. Adverse reactions related to egg ingestion, the frequency, presentation and amount of egg intake were recorded and immune markers were analysed every 6 months.

duration. Patients remained under observation in the hospital at least two hours after the last dose administration or two hours after symptoms had totally subsided in children who failed.

Egg-OIT protocol

The allergen source used in the initial-day dose escalation and build-up (BP) phases of the egg-OIT was dehydrated EW. The egg-OIT protocol followed the procedure described by Staden et al. [14] with some modifications and consisted of three phases: i. initial-day dose escalation phase, which consisted in the administration in 1 day of 0.08, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 9, 17, 35, 70 and 140 mg of EW protein (cumulative dose 280 mg) at intervals of 20 minutes, ii. BP, which consisted of increases in the dose of 0.02, 0.3, 3, 14, 68, 188, 352, 1404 mg and 2808 mg of EW protein on a weekly basis, and iii. maintenance phase (MP), which consisted of eating at least one undercooked egg (fried egg, scrambled or undercooked omelette) compulsory every 48 hours. Moreover, during this phase, the subject could freely take any other foodstuffs containing raw, cooked or heated egg (i.e. candies, sauces and ice cream).

Elapsed time between baseline DBPCFC and egg-OIT initial-day dose escalation phase was less than 2 weeks. The initial-day dose escalation was carried out in the hospital. The end of this phase was determined by the onset of an allergic reaction to any of the 12 doses or after administration of the last dose (140 mg). Every patient was kept under surveillance for two hours after the last dose was administered. Achieving a minimum amount of EW without symptoms in the initial-day

dose escalation phase was not required to qualify for BP.

The BP started with the highest egg dose tolerated in the initial-day dose escalation phase. Dose increases were performed once a week in the hospital. If the dose was tolerated, the patient continued with the home daily intake of the same amount for the following week. In case of an adverse reaction during BP at increasing dosage, the previously tolerated dose was prescribed daily for the following week and a new attempt of increasing the dose was performed on the next week.

The MP was started only if the child tolerated 2808 mg of EW protein at BP. In case of an adverse event during MP, the subject was evaluated the next day at the unit, and personalized strategies were undertaken according to the severity of the event.

Follow-up

Egg-OIT compliance and recording of adverse reactions were collected by parents/guardians in registry forms during egg-OIT.

Adverse events were classified according to severity as mild (oropharyngeal symptoms [OFS], skin, digestive and/or rhinitis manifestations), moderate (mild adverse events plus mild respiratory distress) and severe (severe respiratory distress and/or symptoms of hypotension) [23]. Parents were trained for prompt recognition and treatment of adverse reactions.

Participants, who had received egg-OIT and passed DBPCFC at 4 months, were instructed to add egg to their diet ad libitum. The children could freely take undercooked egg and any foodstuffs containing raw, cooked

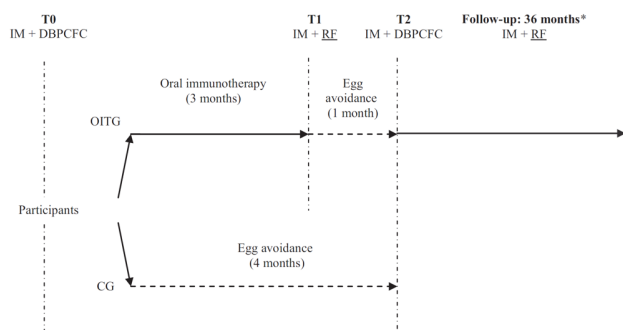


Fig. 1. Study outline. T0, Baseline, T1, 3 months after starting egg-OIT; T2, 4 months after the study had begun; IM, immune markers (skin tests, sIgE and sIgG₄); DBPCFC, double-blind placebo-controlled food challenge; OITG, intervention group; CG, control group; RF, registry forms (egg-OIT compliance and record of adverse reactions). *OITG children who passed DBPCFC at T2. Adverse reactions related to egg ingestion, the frequency, presentation and amount of egg intake were recorded and immune markers were analysed every 6 months.

duration. Patients remained under observation in the hospital at least two hours after the last dose administration or two hours after symptoms had totally subsided in children who failed.

Egg-OIT protocol

The allergen source used in the initial-day dose escalation and build-up (BP) phases of the egg-OIT was dehydrated EW. The egg-OIT protocol followed the procedure described by Staden et al. [14] with some modifications and consisted of three phases: i. initial-day dose escalation phase, which consisted in the administration in 1 day of 0.08, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 9, 17, 35, 70 and 140 mg of EW protein (cumulative dose 280 mg) at intervals of 20 minutes, ii. BP, which consisted of increases in the dose of 0.02, 0.3, 3, 14, 68, 188, 352, 1404 mg and 2808 mg of EW protein on a weekly basis, and iii. maintenance phase (MP), which consisted of eating at least one undercooked egg (fried egg, scrambled or undercooked omelette) compulsory every 48 hours. Moreover, during this phase, the subject could freely take any other foodstuffs containing raw, cooked or heated egg (i.e. candies, sauces and ice cream).

Elapsed time between baseline DBPCFC and egg-OIT initial-day dose escalation phase was less than 2 weeks. The initial-day dose escalation was carried out in the hospital. The end of this phase was determined by the onset of an allergic reaction to any of the 12 doses or after administration of the last dose (140 mg). Every patient was kept under surveillance for two hours after the last dose was administered. Achieving a minimum amount of EW without symptoms in the initial-day

dose escalation phase was not required to qualify for BP.

The BP started with the highest egg dose tolerated in the initial-day dose escalation phase. Dose increases were performed once a week in the hospital. If the dose was tolerated, the patient continued with the home daily intake of the same amount for the following week. In case of an adverse reaction during BP at increasing dosage, the previously tolerated dose was prescribed daily for the following week and a new attempt of increasing the dose was performed on the next week.

The MP was started only if the child tolerated 2808 mg of EW protein at BP. In case of an adverse event during MP, the subject was evaluated the next day at the unit, and personalized strategies were undertaken according to the severity of the event.

Follow-up

Egg-OIT compliance and recording of adverse reactions were collected by parents/guardians in registry forms during egg-OIT.

Adverse events were classified according to severity as mild (oropharyngeal symptoms [OFS], skin, digestive and/or rhinitis manifestations), moderate (mild adverse events plus mild respiratory distress) and severe (severe respiratory distress and/or symptoms of hypotension) [23]. Parents were trained for prompt recognition and treatment of adverse reactions.

Participants, who had received egg-OIT and passed DBPCFC at 4 months, were instructed to add egg to their diet ad libitum. The children could freely take undercooked egg and any foodstuffs containing raw, cooked

or heated egg. Egg consumption and recording of adverse events that could occur during the 36 months following the DBPCFC at 4 months were verified by clinical visits every 6 months. During the visits, adverse reactions related to egg ingestion, the frequency, presentation and amount of egg intake were recorded. Participants who failed DBPCFC at 4 months were re-desensitized following a modified egg-OIT protocol in which the BP was started 1 day after the DBPCFC with the last tolerated dose in the active challenge.

Participants assigned to CG were invited to follow egg-OIT if failed DBPCFC at 4 months.

Immune markers

Skin prick test and determinations of serum sIgE for EW, OVM (Gal d 1) and OVA (Gal d 2), and determinations of serum-specific IgG₄ (sIgG₄) for EW were performed at baseline and after 3 and 4 months. SPT was performed according to the standard procedure for prick [24] with EW (1 mg/mL), OVA (1 mg/mL) and OVM (1 mg/mL) (Leti, Madrid, Spain). A wheal mean diameter of 3 mm or more compared to the saline control was defined as a positive reaction. Determinations of serum EW-sIgE, OVM-sIgE and OVA-sIgE and determinations of serum EW-sIgG₄ were performed (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Outcomes

The primary study outcome was to assess the induction of SU after 3 months of OIT with egg. We define SU as the ability to consume 2808 mg of EW protein without symptoms in a DBPCFC at 4 months, after OIT for 3 months and egg avoidance diet throughout the entire fourth month. Secondary objectives were to assess: (i) the induction of desensitization, defined by the patient's ability to eat at least one undercooked egg (fried egg, scrambled or undercooked omelette) compulsory every 48 h during MP without adverse reactions; (ii) safety (number and severity of adverse reactions); (iii) individual potential predictors to develop SU (variables considered: baseline age, gender, history of asthma, history of previous anaphylaxis to egg ingestion, frequency and severity of adverse events during OIT, dose triggering symptoms in DBPCFC at baseline and EW-, OVA- and OVM-sIgE at 3 months); (iv) changes in the DBPCFC threshold; and (v) immunological changes throughout the trial.

Sample size

The necessary sample size was predetermined to estimate the proportions of patients with SU after egg-OIT and without it; an α of 95% and a statistical power (1- β) of 90%; an expected proportion of 36% in OITG,

based on the study of Staden *et al.* [14] and 2% in the CG. Assuming a rate of 15% of subjects lost to follow-up in each group, the minimum number of subjects in each group required to perform these estimates was 30.

Statistical analysis

To assess the differences between OITG and CG at baseline and 4 months, intragroup differences in OITG and CG between at baseline and 4 months, with respect to variables related to the selection for the study and immune markers, the Student *t*-test was used for quantitative variables and the chi-square test was applied for qualitative variables.

Fisher's exact test was performed to determine whether the proportions of patients achieving the SU were different between OITG and CG.

All clinical outcomes were assessed by intention-to-treat analysis.

To evaluate the variation of the threshold between baseline and 4 months of OITG patients who did not pass DBPCFC at 4 months, the Wilcoxon signed-rank test was performed. The Mann-Whitney *U*-test was performed to assess differences between the threshold of OITG and CG children who did not pass DBPCFC at 4 months.

Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis studied the diagnostic performance of egg-sIgE at 3 months to predict the DBPCFC result at 4 months. Specificity, Youden index (YI) and likelihood ratio (LR) were used to determine the most appropriate cut-off point. After identifying the cut-off, positive and negative predictive values were calculated to determine the likelihood of passing or failing DBPCFC at 4 months, above or below, respectively, for said cut-off.

Results

Study participants

Sixty-one patients of 91 (67%) who were invited to participate were randomized (Fig. 2). Thirty patients were randomized to OITG and 31 to CG. Sixty-three percent of children were male (73% in OITG and 52% in CG). The age of patients ranged from 5 to 17 years (median, 8 years; IQR, 6 years). Eighty-seven percent of children had a history of atopic dermatitis, 59% of rhinitis, 41% asthma and 63.9% other food allergy. Twenty-three percent (7/30) of the patients in OITG had a history of anaphylaxis due to egg consumption. Seventeen percent (5/30) of OITG and 10% (3/31) of CG had EW-sIgE levels higher than 50 kU/L (ranges: 53.7–245 and 50.5–73 kU/L, respectively). There were no significant differences between OITG and CG in baseline clinical characteristics, except for EW-sIgE levels that were significantly higher in OITG (Table 1).

Outcomes

Clinical outcomes. Ninety-three percent (28/30) of OITG patients were desensitized in a median of 32.5 days (IQR, 14 days). The median duration of the BP in children who needed less than 3 months to be desensitized (83%, 25/30) was 30 days (IQR, 10 days). Ten percent (3/30) of OITG children needed more than 3 months to be desensitized (mean 121 days, SD 16.8 days) due to adverse reactions during the immunotherapy. These patients did not perform an elimination diet or DBPCFC at 4 months and were included in the group of children who did not pass the DBPCFC at 4 months for the statistical analysis. Seven percent of OITG children (2/30) were withdrawn from the study for non-severe (mainly abdominal pain and vomiting) repeated allergic reactions.

At 4 months, 37% (11/30) of OITG children passed the DBPCFC, compared with 3% (1/31) of CG patients who passed it (95% CI for the difference in the response rate, 14 to 51%; $P = 0.003$). All OITG children who

passed the DBPCFC at 4 months regularly consumed foodstuffs containing raw, cooked or heated egg and at least 2 undercooked eggs per week during the 36-month follow-up. Baseline age, gender, history of asthma, history of previous anaphylaxis to egg ingestion, frequency and severity of adverse events during egg-OIT, and the dose that triggered symptoms in DBPCFC at baseline, were not potential predictors of DBPCFC results at 4 months.

The OITG patients ($n = 14$) who did not pass DBPCFC at 4 months increased their threshold mean dose from 100.8 mg EW protein (SD, 96.3 mg) at baseline to 481.3 mg (SD, 417.5 mg) at 4 months ($P = 0.002$). In addition, this dose was significantly higher than the threshold dose in CG patients at 4 months (mean 256.2 mg, SD 425.3 mg) ($P = 0.02$). CG patients showed a non-significant increase in their threshold from baseline (mean 218.3 mg, SD 405.5 mg) to 4 months (mean 256.2 mg, SD 425.3 mg) ($P = 0.41$). There were no differences in threshold at baseline

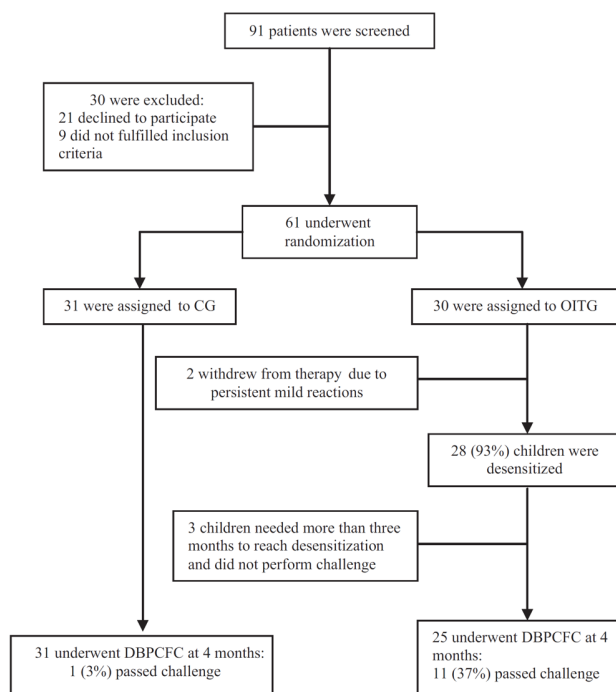


Fig. 2. Study enrolment, randomization, and outcomes. OITG, Intervention group; CG, Control group; DBPCFC, Double-blind placebo-control food challenge.

Table 1. Baseline clinical characteristics, baseline double-blind placebo-controlled food challenge, according to study group. Student's *t*-test and chi-square test

Characteristics	CG (N = 31)	OITG (N = 30)	P
Age – years mean (SD)	8.71 (2.6)	7.80 (2.9)	0.2
Atopic dermatitis – percent	83.8	90	0.7
Asthma – percent	41.9	40	0.9
Allergy to other foods – percent	67.7	60	0.6
Total IgE antibody – kU/L	370.5	603	0.2
median (range)	(33.2–3582)	(143–5000)	
EW-sIgE – kU/L	2.2 (0.7–73)	6.4 (1–245)	0.02
median (range)			
OVA-sIgE – kU/L	2.2 (0.7–43.5)	6.3 (0.7–185)	0.1
median (range)			
OVM-sIgE – kU/L	2.3 (0.7–89.1)	3.1 (0.7–162)	0.4
median (range)			
EW-sIgG ₄ – mg/L	0.2 (0.1–3.6)	0.45 (0.1–6.2)	0.2
median (range)			
Wheal diameter on EW skin prick test – mm	6 (3–12)	6 (3–11)	0.2
median (range)			
Age at first allergic reaction to egg – months mean (SD)	15.7 (13.8)	18.1 (14.8)	0.5
Cumulative dose that elicited symptoms at DBPCFC at T0 – mg of EW protein	162 (9–3600)	72 (9–1708)	0.3
median (range)			

CG, control group; OITG, intervention group; SD, standard deviation; EW, egg white; sIgE, specific IgE; OVA, ovalbumin; OVM, ovomucoid; DBPCFC, double-blind placebo-controlled food challenge.

There were no significant differences between OITG and CG in baseline clinical characteristics, except for EW-sIgE levels that were significantly higher in OITG.

between OIT patients who did not pass DBPCFC at 4 months (mean 100.8 mg, SD 96.3 mg) and CG patients (mean 218.3 mg, SD 405.5 mg) ($P = 0.29$). There were no statistical differences in threshold at baseline between OIT patients who did not pass DBPCFC at 4 months (median 135 mg, IQR 171 mg) and OIT patients who passed the challenge (median 45 mg, IQR 135 mg) ($P = 0.98$).

Adverse events. There were 145 allergic reactions during egg-OIT, 21 (14.5%) in the initial-day dose escalation phase, 79 (54.5%) in BP and 45 (31%) in MP in 70% (21/30) of patients (Table 2).

Initial-day dose escalation phase. Doses triggering reactions on this day were as follows: 140 mg (24%), 70 mg (24%), 35 mg (19%), 17 mg (9%), 9 mg (9%), 5 mg (5%), 2 mg (5%) and 1 mg (5%). No participants reacted with doses of 0.08, 0.2, 0.3 and 0.5 mg.

Build-up phase. There were gastrointestinal symptoms in 82% (65/79) of the reactions, OFS in 21.5% (17/79), rhinitis in 11.4% (9/79), respiratory distress in 6.3% (5/79) and generalized urticaria in 3.8% (3/79). One patient required epinephrine in this phase due to rhinitis, urticaria and mild respiratory distress after a 2404 mg dose. In this case, due to the intensity of the reaction, the protocol was modified and the egg dose was reduced by 50%. He tolerated the new dose every day during 1 week. Further increases were performed following the protocol without reactions. Two children (7%) were withdrawn from the study for non-severe repeated allergic reactions (abdominal pain and vomiting) during BP. These two patients had EW-sIgE levels of 5.6 and 245 kU/L, respectively.

Maintenance phase. All reactions were mild; there were gastrointestinal symptoms in 44% (20/45) of the reactions, OFS in 53% (24/45), rhinitis in 24% (11/45) and generalized urticaria in 9% (4/45). Fifty-seven percent (16/28) of children who completed treatment declared/admitted that they disliked the taste and texture of undercooked egg. However, they continued taking egg according to the protocol.

Follow-up. During the 36-month follow-up of OITG children who passed the DBPCFC at 4 months, one participant referred one single episode of unilateral eye redness and itching after eating fried egg and two other participants reported occasional OFS after eating omelette or fried egg, only in the first 6 months after the DBPCFC at 4 months. In all cases, the symptoms resolved without treatment. The three of them continued taking egg normally until the end of the follow-up period.

The baseline EW-, OVA- and OVM-sIgE levels (kU/L) were higher in patients who suffered any adverse event [median and range: 11.9 (1–245), 8.2 (0.7–185) and 8.6 (0.7–162), respectively] than in those who had not [median and range: 4.0 (1–11.5), 4.9 (0.7–15.5) and 4.7 (0.7–15.5), respectively] ($P < 0.05$). The median EW-, OVA- and OVM-sIgE levels of the three children who needed more than 3 months to be desensitized was 85.3 (range 28.3–164), 69.9 (range 8.4–116) and 45 kU/L (range 15.7–76.5), respectively. Finally, the dose that elicited symptoms at baseline for these participants was 9 mg in two patients and 45 mg in the other one.

Immunological changes. A significant decrease at 4 months compared to baseline was observed in the size of EW, OVA and OVM SPT in OITG ($P = 0.001$) (Table 3). The size of SPT at 4 months was smaller in OITG than in CG, although statistical differences were observed only for OVA and OVM.

There was also a decrease in EW-, OVA- and OVM-sIgE levels in OITG at 4 months compared to baseline,

Table 2. Oral doses associated with symptoms during egg-OIT

Variable		Initial-day Dose Escalation Phase	Build-up Phase	Maintenance Phase	All
Patients with symptoms – <i>n</i> (%)		21 (70%)	16 (53%)	10 (33%)	21 (70%)
Total doses – <i>n</i>		358	1300	792	2450
Any symptom – <i>n</i> (%) of doses per phase)		21 (5.9%)	79 (6.1%)	45 (5.7%)	145 (5.9%)
Symptom type – <i>n</i> (%) of doses per phase)	OFS	12 (3.4%)	17 (1.3%)	24 (3%)	53 (2.2%)
	Generalized	0	3 (0.2%)	4 (0.5%)	7 (0.3%)
	Urticaria				
	Rhinitis	12 (3.4%)	9 (0.7%)	11 (1.4%)	32 (1.3%)
	Respiratory	0	5 (0.4%)	0	5 (0.2%)
	Distress				
	Gastrointestinal	12 (3.4%)	65 (5%)	20 (2.5%)	97 (4%)
Severity – <i>n</i> (%) of doses with any symptom per phase)	Mild	21 (100%)	76 (96%)	45 (100%)	142 (98%)
	Moderate	0	3 (4%)	0	3 (2%)
	Severe	0	0	0	0
Epinephrine treatment – <i>n</i> (%) of doses per phase)		0	1 (0.08%)	0	1 (0.04%)

OFS, oropharyngeal symptoms.

which was only significant for OVA-sIgE ($P < 0.001$). However, no differences were observed in sIgE between OITG and CG at 4 months. An increase in EW-sIgG₄ levels occurred in OITG comparing baseline vs. 4 months ($P < 0.001$) and also comparing OITG vs. CG at 4 months ($P = 0.001$).

Egg white-, OVA- and OVM-sIgE levels in OITG at 3 months were lower among patients who passed DBPCFC at 4 months than those with a positive challenge ($P < 0.02$) (Table 4). There were no differences in either SPT or EW-sIgG₄ levels in 3 months between patients who failed or passed the DBPCFC at 4 months.

Identification of a sIgE cut-off to predict sustained unresponsiveness. Egg white- and OVM-sIgE at 3 months showed the best diagnostic performance. The area

under the curve (AUC) for EW- and OVM-sIgE was 0.78 ($P = 0.02$) and 0.75 ($P = 0.03$), respectively (Fig. 3). The AUC for OVA-sIgE was not statistically significant. The cut-off that showed the best values was 7.1 kU/L for EW-sIgE and 1.7 kU/L for OVM-sIgE. The probability of failing the DBPCFC with EW- or OVM-sIgE levels above the cut-off was 90% and 73%, respectively. The probability of passing the DBPCFC if EW- or OVM-sIgE levels were below the cut-off point was 67% and 70%, respectively.

Discussion

The present randomized controlled trial provides important evidence of early development of sustained unresponsiveness to egg in a significant percentage of

Table 3. Skin prick test median wheal diameter, sIgE and sIgG₄

	OITG			CG			OITG vs. CG 4 months <i>P</i>
	Baseline	4 months	<i>P</i>	Baseline	4 months	<i>P</i>	
Median SPT – mm (range)							
EW	6 (3–11)	5 (3–8)	0.001	6 (3–12)	5.5 (0–13)	0.45	0.16
OVA	5 (0–9)	3 (0–8)	0.001	5 (0–13)	4 (0–11)	0.02	0.03
OVM	5.5 (0–11)	3.5 (0–9)	0.001	6 (0–11)	5.5 (0–14)	0.14	0.02
Median sIgE – kU/L (range)							
EW	6.4 (1–245)	3.1 (0.5–432)	0.15	2.2 (0.7–73)	2.2 (0.4–60.2)	0.47	0.31
OVA	6.3 (0.7–185)	2.2 (0.3–192)	< 0.001	2.2 (0.7–43.5)	1.3 (0.3–32.3)	0.01	0.28
OVM	3.1 (0.7–162)	2.1 (0.3–163)	0.11	2.3 (0.7–89.1)	1.7 (0.3–76.7)	0.17	0.31
Median sIgG ₄ – mg/L (range)							
EW	0.4 (0.1–6.2)	4.4 (0.1–30)	0.0001	0.2 (0.1–3.6)	0.4 (0.1–7.5)	0.02	0.001

SPT, skin prick test; OITG, Intervention group; CG, Control group; EW, egg white; OVA, ovalbumin; OVM, ovomucoid.

persistent egg-allergic patients after a short-course egg-OIT. Thirty-seven percent ($n = 11$) of patients achieved this state after 3 months of treatment compared to only 3% ($n = 1$) of controls who continued an avoidance diet during the same period. Children who developed sustained unresponsiveness continued taking egg ad libitum during 36-month follow-up. The results showed that egg-allergic patients could achieve a state of sustained unresponsiveness after a short period of treatment.

So far, trials of egg-OIT have mainly analysed the efficacy to desensitize to the food [11–20]. Only few studies analysed sustained unresponsiveness after egg-OIT after prolonged periods of treatment [11, 14, 16, 18], all of them with protocols longer than ours. These studies describe sustained unresponsiveness in 28–100% of the population after 21–33 months of egg-OIT. However, if we only consider randomized controlled studies, this percentage ranges between 28% [18] and 36% [14]. These differences might be related to differences in baseline egg-sIgE levels, egg-OIT doses and the treatment duration before sustained unresponsiveness. In our active group, the median baseline EW-sIgE was lower (6.4 kU/L) than reported in the patients treated by Buchanan [11] (8.2 kU/L), Burks [18] (10.3 kU/L) and Vickery [16] (12.5 kU/L). Regardless of the lower sIgE, the higher dose during maintenance (2808 mg of protein) in our study compared to others (300 mg [11] and 1600 mg [18]) might have positively influenced the high ratio of sustained unresponsiveness despite of our shorter protocol.

Table 4. Immune markers of OITG at 3 months according to DBPCFC responses at 4 months

OITG			
Immune markers at 3 months	DBPCFC at 4 months		<i>P</i>
	Negative ($N = 11$)	Positive ($N = 17$)*	
Median SPT – mm (range)			
EW	4.5 (3–8)	4.5 (3–8)	0.76
OVA	3 (0–4)	3 (3–7.5)	0.13
OVM	3 (0–9)	3 (0–6.5)	0.67
Median sIgE – kU/L (range)			
EW	1.8 (0.7–9.3)	9.1 (1–58.8)	0.001
OVA	0.8 (0–6.7)	4.2 (0.3–29.8)	0.02
OVM	0.6 (0–6.7)	6.4 (0–49.7)	0.004
Median sIgG ₄ – mg/L (range)			
EW	3.2 (0.4–25.7)	6.9 (0.7–30)	0.53

SPT, skin prick test; EW, egg white; OVA, ovalbumin; OVM, ovomucoid.

*Data including the three OITG group children who failed achieving maintenance phase in 3 months time. These patients did not undergo the elimination diet or the DBPCFC at 4 months. Data were included in the group of children with positive DBPCFC.

In this study, giving higher doses of egg than other protocols sought two therapeutic targets: i. eliminate the risk of allergic reactions due to accidental food ingestion, and ii. normalize the diet, that is, the patient could freely take egg-containing food in addition to the doses established as egg-OIT maintenance. However, a drawback of the treatment is that 57% of the participants receiving egg-OIT referred difficulty in taking food during the maintenance phase because they disliked either the appearance, the texture and/or the taste of the egg. This has also been observed in other studies [25] and might increase the risk of loss of adherence in longer protocols. The state of sustained unresponsiveness enables patients to take food in any form, any amount and whenever they want, without the fear of an allergic reaction. In this state, the necessity to take the food with strict periodicity disappears, unlike what happens with the state of desensitization. Nevertheless, a total avoidance of the food is not recommendable as it has been proven with a peanut-OIT model [26] that sustained unresponsiveness is transient in most of the cases. In the present study, only three patients who passed DBPCFC at 4 months, had occasional mild reactions that resolved without treatment in the first 6-month follow-up, safely consuming egg throughout the rest of the follow-up period.

During maintenance, egg was given as undercooked egg to preserve its allergenicity. This point is particularly important because the administration of extensively heated egg does not imply tolerance of raw egg during OIT. Itoh et al. [15] stated that 50% of patients who received OIT with 60 g of heated egg twice a week for more than 9 months did not tolerate 1 g of raw powdered egg after treatment. Therefore, performing both dose increase and maintenance phases with raw and/or nearly raw egg facilitates the tolerance to the most allergenic form of egg, which is raw, and provides protection in a larger extent.

Our treatment proved to be highly effective in desensitizing patients (93% success) compared with other studies (48–92% success) [11–14, 16–20]. Moreover, in patients who were desensitized but did not reach sustained unresponsiveness, significant increases in the threshold of egg in the DBPCFC were observed after egg-OIT. The data are consistent with Skripak et al. [27] who demonstrated that milk OIT is effective in increasing the threshold for reactions to milk [27].

Regarding the safety of the procedure, over a third of patients had no adverse events at all throughout the treatment. Despite the relative high rate of adverse events with this protocol (5.9% of the administered doses), we found it to be lower than reported by other studies in which reactions occurred in between 7.6% [28] and 25% [18] of the administered doses. Elevated egg-sIgE levels were associated with a higher frequency of adverse events during egg-OIT, as described Vaz-

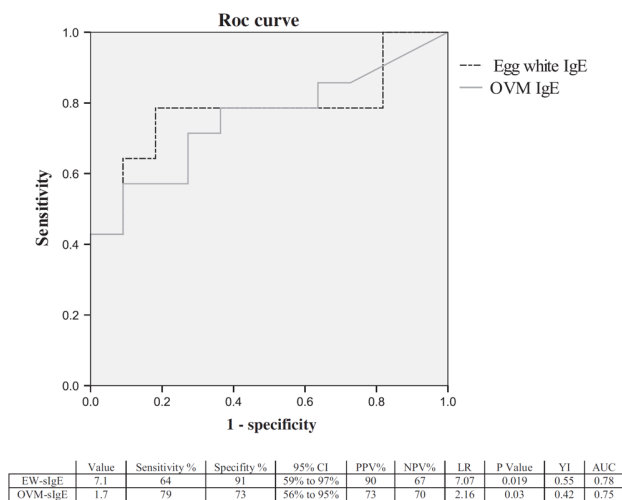


Fig. 3. The discriminative potential of sIgE at 3 months after starting egg-OIT on DBPCFC results after egg-OIT at 4 months. Receiver operating characteristic curves are shown in the figure. Optimal cut points for EW-IgE and OVM-IgE are shown in tabular form below. EW, Egg white; OVM, Ovomucoid; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value; LR, Likelihood ratio; YI, Youden index; AUC, Area under the curve.

quez-Ortiz et al. [28]. In this same sense, and in concordance with the observations of this study, the three children who needed more than 3 months to become desensitized had higher egg-sIgE and a lower threshold at baseline DBPCFC than the patients who completed the build-up phase in less than 3 months.

Although more than 95% of the adverse events observed were mild, 7% (2/30) of patients had to discontinue egg-OIT due to mild but persistent allergic reactions, mainly abdominal pain and vomiting. Accounting with our own previous experience of eosinophilic esophagitis due to milk OIT [29], it was proposed to perform oesophageal endoscopy, but the parents refused it. However, such symptoms subsided without treatment immediately after the OIT was withdrawn. No correlation between withdrawals and specific IgE levels to egg allergens was observed. The withdrawal rate due to adverse reactions was lower than the observed in other studies (12–36%) [14, 18]. These differences in the rate of adverse events and withdrawals due to adverse reactions might be related to the lower egg-sIgE levels in our population compared to these studies. On the other hand, there may be other factors such as asthma, which can influence the frequency of adverse events during egg-OIT. In our population, 41% of the participants had asthma, vs. 64% of the subjects in the study published by Vazquez-Ortiz et al. [28]. Unfortunately, the work of Burks et al. does not offer this information, and we are unable to determine whether the high frequency of

adverse events described in their study was due to an increased frequency of asthma among the treated patients, or to other not covered reasons.

Moreover, although the cumulative dose of egg white protein administered during challenges (2808 mg) was lower than the recommended dose of food protein proposed by PRACTALL consensus [30] for DBPCFC (4443 mg of food protein), no significant adverse events were reported after the completion of 36-month follow-up. Only three patients had very mild and transient symptoms during the first 6 months, but that did not prevent them continue taking egg during the follow-up.

In our study, the changes in egg-specific immune response, as evidenced by decreased wheal size on SPT to egg allergens, were only observed in children receiving egg-OIT and not in the control group. However, there were no differences in SPT in 3 months between patients who failed or passed the DBPCFC at 4 months, in contrast to other OIT studies in which wheal size on SPT was inversely related to the probability of sustained unresponsiveness [18, 31]. On the other hand, sIgE levels for EW, OVA and OVM were lower in children who achieved sustained unresponsiveness than in those who did not pass DBPCFC at 4 months. This variable did not correlate with sustained unresponsiveness in the study of Burks et al., [18] but our results in the allergen-specific IgE levels are consistent with those of Vickery et al. [31] where patients who successfully passed a challenge 1 month after stopping peanut-OIT

had lower peanut sIgE levels at baseline and at the time of challenge compared with the subjects who failed [31]. The study concluded that smaller skin test results and lower peanut sIgE levels were predictive of a successful outcome. In the present study, EW-sIgE levels after the 3 months of egg-OIT showed the best capacity to predict the outcome of the DBPCFC 1 month after stopping treatment. Levels above the EW-sIgE cut-off of 7.1 kU/L indicated 90% probability to fail the DBPCFC. This cut-off for EW-sIgE is similar to the diagnostic decision point proposed by Sampson [32] who demonstrated that egg-specific IgE levels above 7 kU/L identify patients with > 95% probability of reacting to egg [32]. However, these results need to be interpreted with caution, as Sampson referred to diagnostic procedure in regular patients, whilst our cut-off regards to OIT-treated patients evaluating sustained unresponsiveness after an elimination diet preceded by an egg-OIT. Therefore, levels of egg-sIgE throughout egg-OIT could be used to establish the most appropriate time to stop the treatment and confirm sustained unresponsiveness after an avoidance diet period. Specific IgE levels were used previously to draft the build-up phase dosage by other authors [16], and according to our data, it could be used also to tailor the duration of maintenance phase and choose the best moment to assess sustained unresponsiveness in each individual. Immune markers were analysed in children who developed sustained unresponsiveness every 6 months during the 36-month follow-up. SPT and sIgE to egg allergens progressively decreased along this period (data not shown).

An increase in egg white-specific IgG₄ levels occurred in egg-OIT patients comparing baseline with 4 months and also comparing egg-OIT with control patients at 4 months. In other egg-OIT protocols [18], patients who achieved sustained unresponsiveness had higher specific IgG₄ levels than patients who did not reach this state. However, in our study, we failed to detect such differences. We consider it could be due to our shorter protocol. As sIgG₄ changes start to become significant after 3 or 4 months [33], it is more likely that it was too early to detect such changes rather than these changes did not happen, although there is evidence of a lack of significant increase in this biomarker in other OIT trials [26].

One of the weaknesses of the study is the absence of a placebo group; however, the use of DBPCFC before enrolment and after OIT, and the randomization process, minimized this weakness. Moreover, the lower level of sIgE to egg proteins compared to other studies could have lead to a greater success ratio. Therefore, the robust evidence provided in this study enables its

extrapolation to patients with a similar profile, but should be cautiously applied in the case of patients with higher sIgE levels. Another weakness of this study could be the low sample size to assess predictors for sustained unresponsiveness, but considering the differences between groups, it seems to be enough to ascertain those differences.

In conclusion, this study shows how 37% of patients with persistent egg allergy developed sustained unresponsiveness following oral immunotherapy during 3 months with higher doses of raw egg than other protocols. Also, this strategy was safe and effective in 93% of children to induce desensitization. The protocol also allowed patients to take any other foodstuffs containing raw, cooked or heated egg during the state of desensitization. Levels of egg-sIgE throughout egg-OIT could be used as potential predictors of sustained unresponsiveness. No correlation between other variables and development of sustained unresponsiveness was observed.

Future needs arise from this study such as the identification of other immune markers to predict the likelihood of sustained unresponsiveness, the reduction in the frequency of adverse events and the customization of the treatment duration.

Acknowledgements

We thank C. Quiñonero, I. Sanz, A. López, E. Doval, C. Ballesteros and MJ. Jiménez, nurses and nurse assistants, for their extensive work in our daily practice and especially for their contribution to the clinical work of this manuscript. We are also grateful to the patients and families who kindly participated. Thanks to Stallergenes for their financial support for the English version of this manuscript.

Contributors

CE and MDI conceived, designed and directed the study. NP and CG contributed to the statistical design and data analysis of the study. CE, PRR, SSG, IPR and MDI carried out the clinical procedures. All authors contributed to and reviewed the final manuscript.

Funding

Non-funded study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Prescott S, Allen KJ. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22:155–60.
- 2 Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE *et al*. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:668–76.
- 3 Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Host A, Bindslev-Jensen C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:567–73.
- 4 Eggesbo M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. *Allergy* 2001; 56:403–11.
- 5 Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood RA. The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1413–7.
- 6 Sicherer SH, Wood RA, Vickery BP *et al*. The natural history of egg allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:492–9.
- 7 Bacal LR. The impact of food allergies on quality of life. *Pediatr Ann* 2013; 42:141–5.
- 8 Bollinger ME, Dahlquist LM, Mudd K, Sonntag C, Dillinger L, McKenna K. The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96:415–21.
- 9 Beyer K, Eckermann O, Hompes S, Grabenhenrich L, Worm M. Anaphylaxis in an emergency setting-elicitors, therapy and incidence of severe allergic reactions. *Allergy* 2012; 67:1451–6.
- 10 Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1164–8.
- 11 Buchanan AD, Green TD, Jones SM *et al*. Egg oral immunotherapy in non anaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:199–205.
- 12 Patriarca G, Nucera E, Pollastrini E *et al*. Oral specific desensitization in food-allergic children. *Dig Dis Sci* 2007; 52:1662–72.
- 13 Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L *et al*. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2007; 39:12–9.
- 14 Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 2007; 62:1261–9.
- 15 Itoh N, Itagaki Y, Kurihara K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergol Int* 2010; 59:43–51.
- 16 Vickery BP, Pons L, Kulis M, Steele P, Jones SM, Burks AW. Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 105:444–50.
- 17 García Rodríguez R, Urrea JM, Feo-Brito F *et al*. Oral rush desensitization to egg: efficacy and safety. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:1289–96.
- 18 Burks AW, Jones SM, Wood RA *et al*. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med* 2012; 367:233–43.
- 19 Meglio P, Giampietro PG, Carello R, Gabriele I, Avitabile S, Galli E. Oral food desensitization in children with IgE-mediated hen's egg allergy: a new protocol with raw hen's egg. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24:75–83.
- 20 Fuentes-Aparicio V, Alvarez-Perea A, Infante S, Zapatero L, D'Oleo A, Alonso-Lebrero E. Specific oral tolerance induction in paediatric patients with persistent egg allergy. *Allergol Immunopathol* 2013; 41:143–50.
- 21 Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U *et al*. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59:690–7.
- 22 Escudero C, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P *et al*. Dehydrated egg white: an allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24:263–9.
- 23 Clark AT, Ewan PW. Food allergy in childhood. *Arch Dis Child* 2003; 88:79–81.
- 24 Dreborg S, Frew A. Position paper: allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48(14 Suppl.):48–82.
- 25 Schneider LC, Rachid R, Lebovidge J, Blood E, Mittal M, Umetsu DT. A pilot study of omalizumab to facilitate rapid oral desensitization in high-risk peanut allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:1368–74.
- 26 Syed A, Garcia MA, Lyu SC *et al*. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:500–10.
- 27 Skripak JM, Nash SD, Rowley H *et al*. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:1154–60.
- 28 Vazquez-Ortiz M, Alvaro M, Piquer M *et al*. Baseline specific IgE levels are useful to predict safety of oral immunotherapy in egg-allergic children. *Clin Exp Allergy* 2014; 44:130–41.
- 29 Sánchez-García S, Rodríguez Del Río P, Escudero C, Martínez-Gómez MJ, Ibáñez MD. Possible eosinophilic esophagitis induced by milk oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1155–7.
- 30 Sampson H, van Wijk RG, Bindslev-Jensen C *et al*. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology–European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:1260–74.
- 31 Vickery BP, Surlock AM, Kulis M *et al*. Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:468–75.
- 32 Sampson H. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:891–6.
- 33 Jones SM, Pons L, Roberts JL *et al*. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:292–300.

Editor's Choice

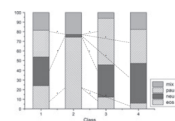
The Editor takes a closer look at some of this month's articles

Asthma and eicosanoids: a cluster headache

Since we advocated interrogating the heterogeneity of asthma using advanced biostatistical tools such as cluster analysis, no study of asthma phenotypes has been complete without some sort of multidimensional method to making sense of complexity [1]. In this issue, Mastalerz *et al.* (pp. 1779–1789) used this approach to relate concentrations of eicosanoids in sputum with clinical aspects of asthma in 139 adult asthmatics. Four clusters were identified. Two of these had mild-to-moderate asthma and one of which appeared to be in remission, at least in terms of inflammation. Two had severe asthma, one of which had a high rate of aspirin hypersensitivity and equated to 'hypereosinophilic' asthma identified in other cluster analyses [2, 3]. The other severe cluster had a more neutrophilic pattern of inflammation which interestingly had increased levels of PGE₂, an eicosanoid usually associated with anti-inflammatory activity. The challenge is to now take these clusters and link eicosanoids to pathogenesis.



Lucyna Mastalerz



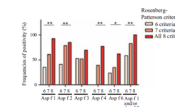
Distribution of phenotypes based on induced sputum cell count in four latent classes. [See figure 1 in L. Mastalerz *et al.* (pp. 1779–1789).]

Fungal allergy in asthma: component-resolved approaches?

The greater focus on severe asthma as an unmet need in recent years has emphasized the epidemiological link between sensitization to thermotolerant filamentous fungi, in particular *Aspergillus fumigatus*, and bronchiectasis and fixed airflow obstruction [4]. The field has been dominated for the last four decades by the use of the term allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), which is defined by a set of largely anecdotal criteria which as Maturu and Agarwal (pp. 1765–1778) point out in their review article are honoured largely in the breach. Indeed, Wardlaw and colleagues (pp. 1746–1749) have even suggested in an accompanying editorial that the term has outlived its usefulness and should be replaced with allergic fungal airway disease to capture all those with fungal allergy at risk of developing lung damage. A central issue is why do some people IgE-sensitized to *A. fumigatus* develop severe disease, whereas in others it does not seem to have significant sequelae. Part of the answer may be in the time since diagnosis or the amount of exposure to colonizing fungi, but Fukutoni *et al.* have tested the hypothesis that it may be due to the allergenic components to which an individual is sensitized. They divided their patients into those with ABPA and those sensitized who did not meet the traditional criteria (using an IgE of >417 IU/L as a cut-off) and found that Asp F1 and Asp F2 were most closely associated, although in ROC curves the levels of specificity and sensitivity were modest. A novel and potentially fruitful way to predict the risk of lung damage in asthma.



Hidenori Tanimoto



Association between the frequencies of IgE to Af components and the number of Rosenberg-Paterson criteria met. *, *P*-trend <0.05; **, *P*-trend <0.01. [See figure 4 in H. Tanimoto *et al.* (pp. 1790–1800).]

Egg allergy: short-course oral immunotherapy can work

Egg allergy is a common, distressing and potentially dangerous problem for young children in particular, which has a major impact of quality of life for the whole family [5]. Oral immunotherapy is rapidly becoming an attractive and effective option for children with egg allergy although optimal regimes that combine effectiveness, convenience and safety are still being worked out [6]. Escudero *et al.* (pp. 1833–1843) have contributed to this debate by reporting on their experience with a short form of immunotherapy. 93% of children achieved tolerance after three months of IT and of those a third had a negative challenge one month after avoidance suggesting prolonged tolerance. This compared to 3% of control children. All those who developed tolerance were eating egg at 36 months. Encouraging data indeed.



Carmelo Escudero



A child eating a cake. (Noah Williams. Photograph courtesy of Andrew Williams, Advanced Nurse Practitioner in Allergy, Guys & St Thomas' Hospitals NHS Foundation Trust, London, UK.)

References

- 1 Wardlaw AJ, Silverman M, Silva R, Pavord ID, Green R. Multi-dimensional phenotyping: towards a new taxonomy for airway disease. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1254–62.
- 2 Haldar P, Pavord ID, Shaw DE *et al.* Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:218–24.
- 3 Lotvall J, Akalis CA, Bacharier LB *et al.* Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:355–60.
- 4 Fairs A, Agbette J, Hargadon B *et al.* IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is associated with reduced lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1362–8.
- 5 Unasunthar T, Leonardi-Bee J, Hodes M *et al.* Incidence of fatal food anaphylaxis in people with food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2013; 43:1333–41.
- 6 Nowak-Węgrzyn A, Albin S. Oral immunotherapy for food allergy: mechanisms and role in management. *Clin Exp Allergy* 2015; 45:368–83.

Caption to cover illustration: Early sustained unresponsiveness after short-course egg oral immunotherapy (Image from Wikimedia Commons).

This logo highlights the Editor's Choice articles on the cover and the first page of each of the articles.

9.13. Anexo XIII: Trayectoria del doctorando.

En este Anexo se describe la trayectoria investigadora del candidato, incluyendo los cursos de doctorado y las líneas de investigación y las publicaciones científicas relacionadas con el tema del presente estudio.

9.13.1. Cursos de Doctorado y Líneas de investigación relacionadas con el ámbito del estudio.

9.13.1.1. Cursos de Doctorado

1. Avances en Endocrinología y Nutrición. Aprobado. 1999-2000.
2. Exploración Funcional y Fisiopatología Respiratoria. Sobresaliente. 1999-2000.
3. La Radiología del año 2000. Sobresaliente. 1999-2000.
4. Las Fuentes de Información en Ciencias de la Salud vía Internet. Aprobado. 2000-2001.
5. Tratamiento Etiológico en Patología Alérgica Respiratoria. Notable. 2000-2001
6. Patología Alérgica Ocupacional. Notable. 2000-2001.
7. Trabajo en Investigación en Medicina Interna II. Asma ocupacional por huevo en trabajadores de panadería. Sobresaliente. 2001-2002.

9.13.1.2. Líneas de investigación relacionadas con el ámbito del estudio

1. Estudio de la alergenidad de la clara de huevo deshidratada en comparación con la clara de huevo cruda.
2. Ensayo clínico sobre la seguridad y la eficacia de la ITOH con clara de huevo deshidratada para el tratamiento de la alergia al huevo mediada por IgE.
3. Estudio de la evolución de citoquinas Th1 y Th2 en pacientes sometidos a ITOH.
4. Estudio de la evolución a largo plazo de los pacientes que reciben ITO: Tolerancia permanente y satisfacción relacionada con la ITOH.
5. Ensayo clínico sobre la seguridad y eficacia de la ITOH utilizando una fase de inducción rápida.

6. Estudio sobre la utilidad de la dosis umbral de tolerancia al huevo para determinar la dosis de inicio de la fase de inducción de la ITOH.
7. Validez de los puntos de cortes de IgE específica a clara de huevo y OVM para confirmar el estado de tolerancia permanente tras ITOH.

9.13.2. Producción científica relacionada con el ámbito del estudio

9.13.2.1. Revistas.

1. Ibáñez MD, **Escudero C**, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P. Comprehensive Review of Current Knowledge on Egg Oral Immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(5):237-250. PMID: 26727760.
2. Pérez-Rangel I, Rodríguez del Río P, **Escudero C**, Sánchez-García S, Sánchez-Hernández JJ, Ibáñez MD. Efficacy and safety of high-dose rush oral immunotherapy in persistent egg allergic children. A randomized clinical trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118(3):356-364. DOI: 10.1016/j.anai.2016.11.023.
3. Martorell A, Alonso E, Echeverría L, **Escudero C**, García-Rodríguez R, Blasco C, Boné J, Borja-Segade J, Bracamonte T, Claver A, Corzo JL, De la Hoz B, Del Olmo R, Domínguez O, Fuentes-Aparicio V, Guallar I, Larramona H, Martín-Muñoz F, Matheu V, Michavila A, Ojeda I, Ojeda P, Piquer M, Poza P, Reche M, Rodríguez Del Río P, Rodríguez M, Ruano F, Sánchez-García S, Terrados S, Valdesoiro L, Vázquez-Ortiz M. Oral immunotherapy for food allergy: a spanish guideline. Egg and Milk Immunotherapy Spanish Guide (items guide). Part I. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(4):225-237. PMID: 28731411.
4. Martorell A, Alonso E, Echeverría L, **Escudero C**, García-Rodríguez R, Blasco C, Boné J, Borja-Segade J, Bracamonte T, Claver A, Corzo JL, De la Hoz B, Del Olmo R, Domínguez O, Fuentes-Aparicio V, Guallar I, Larramona H, Martín-Muñoz F, Matheu V, Michavila A, Ojeda I, Ojeda P, Piquer M, Poza P, Reche M, Rodríguez Del Río P, Rodríguez M, Ruano F, Sánchez-García S, Terrados S, Valdesoiro L, Vázquez-Ortiz M. Oral immunotherapy for food allergy: a spanish guideline. Egg and Milk Immunotherapy Spanish Guide (items guide). Part II. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(5):279-290. DOI: 10.18176/jiaci.0178.

9.13.2.2. Libros

1. **Escudero Díez C**, Rodríguez Álvarez M, García Rodríguez R, Vázquez Ortiz M, Pozas Guedes P. Tratamiento inmunomodulador de la alergia a los alimentos. En Ergon. Tratado de Alergología. Majadahonda (Madrid) 2015. 1111-1129. ISBN: 978-84-16270-39-2.

9.13.2.3. Premios recibidos, comunicaciones y ponencias en Congresos Nacionales e Internacionales.**9.13.2.3.1. Premios recibidos**

1. Chiarella-Privette GM, **Escudero C**, Méndez-Brea P, Sánchez-García S, Rodríguez Del Río P, Ibáñez MD. Clinical and feeding behaviour assessment of egg oral immunotherapy treated children after 7 years of follow up Food allergy / Food allergy: management. Allergy. 2017;72(Suppl 103):533.
Premio a la mejor comunicación. Thematic Poster Session. Pediatric Food Allergy. Congreso de la European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EACCI), Helsinki (Finlandia), 19 de junio de 2017.

0921 | Cow's milk protein allergy – a retrospective study in a pediatric clinic from Nord-East of Romania

Anton-Paduraru D; Trandafir L; Drochioi A
Iasi, Romania

Introduction: Numerous researches studied food allergies components, including cow's milk protein allergy (CMPA).

Objectives: The purpose of this study was to underline the clinical course and therapeutic aspects of CMPA in children.

Methods: The study group consisted of 124 patients hospitalized in 3rd Clinic of Pediatrics, "St.Maria" Children's Emergency Hospital, Iasi-Romania, on a period of 5 years for symptoms suggestive of CMPA. We follow at these patients: clinical and laboratory data to establish a correct diagnosis (epidemiological data related to the onset of disease, the patient's history of atopy, age of onset, type of food, disease manifestations, biochemical diagnosis methods, intestinal biopsy, stool chemistry, specific immunoglobulin E) and the association, in some cases, of the sensitization to other proteins component supply (soy, egg, gluten, disaccharides).

Results: In the study group 60.48% of patients had gastrointestinal manifestations, 19.35% - respiratory manifestations, 8.87% - skin manifestations, 3.22% - mixed manifestations. The highest prevalence of CMPA was observed in the group aged 0-3 months (37.08%), followed by 3-6 months age group (32.25%), as confirmed by studies in the literature. From researching eating behavior of patients, revealed that at the onset of symptoms, 11 (8.87%) were natural fed, 49 (39.51%) - artificially fed, 21 (16.93%) - mixed fed, and 43 patients (36.76%) had complementary diet. It has been observed that in most cases (72.58%) symptoms started within the first 10 days after the introduction of cow's milk. In 11 cases (8.87%) the symptoms started in the early hours. 46.77% had varying degrees of malnutrition. Reducing bodies were present in the stool of 109 patients with digestive symptoms and Adler method revealed in 5 cases occult bleeding which led to the iron deficiency anemia. Intestinal mucosal biopsy performed in cases with digestive CMPA forms showed nonspecific lesions, which imposed correlation with the clinical and histological outcomes of disease evolution. Based therapy was represented by the exclusion of cow's milk protein from the diet. The response was favorable in most cases (74.20%). Failure to follow the dietary recommendations resulted in recurrence of symptoms in 25.80% of cases.

Conclusions: CMPA is a common cause of infant malabsorption, representing a complication of artificial nutrition, these patients requiring special nutritional recommendations.

0923 | Clinical and feeding behaviour assessment of egg oral immunotherapy treated children after 7 years of follow up

Chiarella-Privette GM; Escudero C; Méndez-Brea P;
Sánchez-García S; Rodríguez Del Río P; Ibáñez MD

Allergy Department, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

Introduction: Egg oral immunotherapy (EOIT) is an active treatment option to desensitize allergic children. However, long-term studies are scarce.

Objectives: Describe the clinical situation and feeding behaviors regarding the egg intake of children who successfully completed build-up and maintenance phase of EOIT conducted seven years ago.

Results: Cross-sectional telephone survey analyzing egg reactivity and eating habits in an EOIT cohort with 7 years of follow-up. 55 of 61 (90%) subjects included in the trial successfully completed EOIT protocol started seven years ago [64% (39/61) males, current median age of 16 (range 12-25) years], 8% of patients discontinued the treatment due to digestive and/or respiratory symptoms and 2% by parents decision. 67% (41/61) achieved sustained unresponsiveness confirmed by negative egg oral challenge after 1 month of egg-free diet; 23% (14/61) are still in the maintenance phase, consuming undercooked egg at least 3 times a week, and they have not yet performed oral food challenge after egg-free diet. 89% (49/55) of patients who successfully completed EOIT answered the telephone assessment; 11% couldn't be reached. 71% (35/49) of patients were consuming egg at least 3 times/week. 69% (34/49) of patients were consuming unbaked and baked egg in any presentation, 22% consumed only baked egg and 8% consumed only foods containing egg traces. 43% of children declared/admitted that they disliked the taste/texture of unbaked egg but have good adherence and 14% were afraid to consume egg. 16% (8/49) of subjects had adverse reactions related to egg ingestion during the maintenance phase. Only 3 patients avoid cofactors before and after consuming egg. The family of one patient regretted of performing EOIT because the implied risk, however 100% of the parents would recommend EOIT to other patients.

Conclusions: Egg oral immunotherapy is an effective long-term treatment in the majority of patients. Moreover, 67% of them achieved sustained unresponsiveness along the treatment and are consuming egg without conditions. On the other hand, 8% of patients who successfully completed oral immunotherapy are consuming only foods containing egg traces with the risk of losing tolerance. Most families are satisfied with the treatment and 100% recommend it.



Monday

Prior Winners – 19 June 2017

Room Name	Session Type Name	Session Number	Session Title	Abstract Number	Abstract Title	Author First name	Author Surname	Author Country	Winner
Session Room: Hall 3e	Oral Abstract Sessions	OAS 15	Inflammatory skin diseases: Mechanisms and associations	0039	Is there an increased risk of non-melanoma skin cancer in patients with atopic dermatitis treated with oral immunosuppressive drugs?	Floor	Garrtsen	Netherlands, The	x
Session Room: Hall 3g	Oral Abstract Sessions	OAS 16	What do animals teach us about asthma?	0047	The metabolic D-tryptophan from probiotic bacteria ameliorates allergic airway disease and influences the gut microbiome	Sabine	Barel	Germany	x
Session Room: Room 103a	Oral Abstract Sessions	OAS 17	Factors influencing the development of allergic diseases	0049	Airway microbial dysbiosis in pre-school children associates with respiratory symptoms	Tamer	Smolders	Netherlands, The	x
Session Room: Room 103a	Oral Abstract Sessions	OAS 18	Immunotherapy: Measures and outcomes	0058	Immunotherapy during omalizumab protection: a clinical trial on severely psoriasis allergic adolescents	Josef	Brandstör	Sweden	x
Session Room: Room 102	Oral Abstract Sessions	OAS 19	Diagnostic tools in food allergy	0066	Skin prick test preparations for seafood allergy? A molecular and immunological assessment	Andrew	Lopata	Australia	x
Session Room: Hall 3b	Oral Abstract Sessions	OAS 20	Managing asthma from infancy to adolescence	0074	Sex-shift of respiratory multinorbidity prevalence during adolescence – pooled analyses of longitudinal european birth cohort data from meta	Theresa	Keller	Germany	x
Session Room: Hall 3c	Oral Abstract Sessions	OAS 21	New approaches to the diagnosis and management of food allergy	0084	A randomized, double-blind, placebo-controlled, pivotal multicenter trial with budesonide orodispersible tablets for treatment of active eosinophilic esophagitis (eos-1)	Stephan	Mishake	Germany	x
Session Room: Hall 3e	Oral Abstract Sessions	OAS 22	What's new in aerobiology	0087	School neighbouring affects lung function and the autonomic nervous system in adolescents	Inés	Paelecia	Portugal	x
Session Room: Room 102	Oral Abstract Sessions	OAS 23	Novel mechanisms in rhinitis and rhinosinusitis	0091	Thymic differentiation of LK2 promotes neutrophilic airway inflammation in nasal polyps of CSF2BP in cystic fibrosis	Kornelisz	Goebels	Poland	x
Session Room: Room 102	Late Breaking Oral Abstract Sessions	LB OAS 1	Food allergy - Epidemiology and mechanism	1432	Replication of the association of the STAT6 gene with food allergy, as diagnosed by DBPFC	Corrella	van Ginkel	Netherlands, The	x
Session Room: Hall 3f	Late Breaking Oral Abstract Sessions	LB OAS 2	Asthma - genetics, immunoresponse and management	1427	MicroRNA-146a modulates immune responses to human rhinovirus in primary airway epithelial cells	Ana	Rebane	Estonia	x
Poster Discussion Zone 1	Poster Discussion Sessions	PDS 10	Rhinoconjunctivitis	0229	The effect of Hsp65, Hsp70, and Hsp90 in allergic rhinitis mouse model	Ji-Hun	Mo	South Korea	x
Poster Discussion Zone 2	Poster Discussion Sessions	PDS 11	Anaphylaxis: From epidemiology to management	0246	Global review of epinephrine availability and anaphylaxis management practices amongst patient organization countries	Sean	Waterman	Canada	x
Poster Discussion Zone 4	Poster Discussion Sessions	PDS 12	Daily management of drug allergy	0251	Assessment of oral provocation test results with alternative iron salts among patients who have oral iron hypersensitivity	Ozge	Ozturk atkas	Turkey	x
Poster Discussion Zone 1	Poster Discussion Sessions	PDS 13	From adaptive immune response to mast cells	0271	Phenotypic and functional characterization of a set of microRNAs in shaping the Th2 phenotype in allergic airway inflammation	Ayşe	Kilic	Germany	x
Poster Discussion Zone 2	Poster Discussion Sessions	PDS 14	Food allergy epidemiology	0278	A multicenter retrospective study of 2,801 cases with immediate-type food allergy in Korean children	Kyunguk	Jeong	South Korea	x
Poster Discussion Zone 3	Poster Discussion Sessions	PDS 15	Occupational allergy: What's new?	0284	Sensitisation in Norwegian crab processing workers	Marte	Thomassen	Norway	x
Poster Discussion Zone 4	Poster Discussion Sessions	PDS 16	The spectrum of pediatric skin and drug allergy	0305	Analysis of potential contact allergens in cosmetics intended to use in newborns and infants	Karolina	Dumycz	Poland	x
Poster Discussion Zone 1	Poster Discussion Sessions	PDS 17	Primary immunodeficiency	0312	Subcutaneous Ig replacement therapy in primary and secondary Hyperimmunoglobulinemia. A retrospective single center study of 200 patients	Francesco	Civetto	Italy	x
Poster Discussion Zone 2	Poster Discussion Sessions	PDS 18	Pediatric food allergy	0323	Donkey's milk tolerability and palatability in cow's milk allergic children	Simona	Barni	Italy	x
Poster Discussion Zone 3	Poster Discussion Sessions	PDS 19	Epidemiology, risk factors and clinical aspects of drug allergy	0341	Epidemiology of pediatric adverse drug reactions (ADRs) in Korea using big data of 48.1 million south Korean health-care records and KAREs (Korea adverse event reporting system) database	Gwang-Choon	Jang	South Korea	x
Poster Discussion Zone 4	Poster Discussion Sessions	PDS 20	Asthma genetics	0357	17Q21 gene variation increases the risk of exacerbations in asthmatic children treated with inhaled corticosteroids: a meta-analysis in the multi-ethnic pica consortium	Nitoufar	Farzan	Iran	x
Poster Discussion Zone 3	Late Breaking Poster Discussion Sessions	LB PDS 4	Allergen immunotherapy: Vaccines and clinical	1503	Reduction of new onset and progression of asthma	Ulrich	Wahn	Germany	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 20	Immunotherapy - Efficacy, safety and individualized therapy	0871	Efficacy of the subcutaneous immunotherapy performed in a woman with a whole body extract of pseudomyxoma ant. in Argentina	Raquel	Rodriguez	Argentina	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 21	Asthma mechanisms	0891	Modulating factors of cortisol response to an exercise challenge	Diana	Silva	Portugal	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 22	Nutritional and psychosocial issues in food allergy	0899	Longitudinal study shows improved nutrient intakes and growth with an amino acid formula for children ≥ 1y with cow's milk allergy and related conditions	Kelly	Sorenson	United Kingdom	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 23	Pediatric food allergy	0923	Clinical and feeding behaviour assessment of egg oral immunotherapy treated children after 7 years of follow up	Cherubs	Cherubs	Spain	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 24	Cellular diagnostics and IgE test development	0933	Toward fully leveraging the capabilities of basophil activation test in clinical research through workflow simplification and standardization	Rhiane	Arif	France	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 25	Component resolved Diagnosis	0953	Five-years follow-up in Italian children with seasonal allergic rhinitis: preliminary data	Francesca	Cipriani	Italy	x
Poster Exhibition	Thematic Poster Sessions	TPS 26	Early life factors in the development of allergic disease	0967	Risk factors associated with eczema throughout childhood	Toshinori	Nakamura	Japan	x

Update: 6/26/2017
Status: Final
Version: 01

Page 1 | 2

9.13.2.3.2. Comunicaciones

1. Escudero C. Food challenges in patients with egg allergy: advantages of using dehydrated egg white in comparison with fresh egg white. *Allergy*. 2010;65 (Suppl 92): 81.
2. Escudero C. Pruebas de exposición en pacientes con alergia al huevo: Ventajas de la utilización de clara de huevo deshidratada en comparación con clara de huevo fresca cruda. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(Suppl 2):184.
3. Escudero C. Inmunoterapia con clara de huevo deshidratada: estudio de efectividad y evolución randomizado. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(Suppl 2):118.
4. Escudero C. Oral immunotherapy with dehydrated egg white: randomised study of efficacy, safety and follow-up. *Allergy*. 2011;66(Suppl 94): 320–481.
5. Escudero C, Sánchez García S, Rodríguez del Río P, Ibáñez MD. Estado actual de la inmunoterapia oral con alimentos. Eficacia: desensibilización y Tolerancia. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(Suppl 4):7.
6. Escudero C, Sánchez-García S. Protocolo de inmunoterapia oral con huevo. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(Suppl 4):28.
7. Escudero C, Sánchez Vega S, Ruiz García M, Sánchez García M, Rodríguez del Río P, Ibáñez Sandín MD. Inmunoterapia con clara de huevo deshidratada: Estudio de efectividad, seguridad y seguimiento a largo plazo. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011; 21(Suppl 4):140.
8. Escudero C, Pastor Vargas C, Rodríguez del Río P, Sánchez García S, Pérez Rangel I, Ibáñez Sandín MD. Análisis de citoquinas Th2/Th1 como marcadores de evolución en la inmunoterapia oral con huevo. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012; 22(Suppl 1):126.

9.13.2.3.3. Ponencias

1. XXIX Congreso de la SEAIC. Estado actual de la inmunoterapia oral con alimentos. Eficacia: desensibilización y Tolerancia. Barcelona. Noviembre 2011.
2. XXXIII Reunión AlergoNorte. Alergia alimentaria, su tratamiento. De la evitación a la desensibilización e inmunoterapia. Tratamiento de la alergia al huevo. San Sebastián. Mayo 2013.
3. XXX Congreso de la SEAIC. Estudio OmaBASE: inmunoterapia oral con alimentos y omalizumab. J Investig Allergol Clin Immunol 2016;26(Suppl 1):21. San Sebastián. Octubre de 2016.
4. XXVI Reunión de la Sociedad de Alergología e Inmunología Clínica de Extremadura. Nuevas perspectivas en desensibilización a alimentos. Zafra (Badajoz). Marzo de 2017.
5. XLVI Reunión de la Sociedad de Alergología e Inmunología Clínica de Andalucía. Alergosur 2017. Inmunoterapia oral en alergia alimentaria. Actualización en inmunoterapia oral en alergia a proteínas de huevo. Úbeda (Jaén). Mayo de 2017.
6. XXV Congreso Nacional de Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica, y XXV Congreso Estatal de Pediatría de Baja California. Guías Españolas de Inmunoterapia con Alimentos. Tijuana, Playas de Rosarito Baja California (México). Julio de 2018.
7. XXV Congreso Nacional de Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica, y XXV Congreso Estatal de Pediatría de Baja California. Desensibilización con Huevo. Tijuana, Playas de Rosarito Baja California (México). Julio de 2018.
8. XXXI Congreso Nacional de la SEAIC. Fármacos biológicos en la Inmunoterapia Oral con alimentos: la experiencia de Omalizumab. Valencia. Octubre de 2018.
9. XLIII Congreso de la SEICAP. Inmunoterapia con alimentos ¿Qué queremos conseguir y cómo mantenerlo? ¿cuáles son las expectativas de futuro? Valencia. Mayo 2019.

